

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

## **EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA DOTARIZINA E FLUNARIZINA EM CAMUNDONGOS**

**ONDIVALDO SILVA JÚNIOR**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

**Orientador:** Prof. Dr. Nelson H. Gabilan

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Adair Roberto S. dos  
Santos

Florianópolis

**2005**

## 1. INTRODUÇÃO

A dor, segundo o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o estudo da Dor (I.A.S.P.) é definida como uma subjetiva e desagradável experiência sensorial e emocional, que está normalmente associada a uma lesão tecidual atual ou potencial ou descrita como tal dano (PETERSON *et al.*, 1993; MILLAN, 1999; PORRECA *et al.*, 2002). Os transtornos dolorosos constituem um problema de saúde pública, podendo gerar repercussões que incapacitam ou limitam as atividades normais de um indivíduo, funcionando como um sistema de advertência que pode tornar-se crônico (COLOMBINI, 1991; COWAN *et al.*, 2001; PORRECA *et al.*, 2002). Em 1906, SHERRINGTON propôs a existência dos nociceptores, um neurônio sensorial primário que é ativado por estímulos que têm a capacidade de causar dano tecidual. A sensação denominada dor, geralmente acompanha a maioria das enfermidades da humanidade. Assim como outras sensações, a dor pode ser modulada por uma série de experiências comportamentais, pois não envolve somente a transmissão do estímulo nocivo, mas também diferentes fatores emocionais, sociais, culturais ambientais e cognitivos (MERSKEY, 1979; RUSSO & BROSE, 1998; JULIUS & BASBAUM, 2001). Nem todo estímulo nocivo que ativa os nociceptores deflagra necessariamente uma experiência de dor. A relação entre a percepção da dor e a ativação dos nociceptores envolve uma cascata de eventos pelas vias sensoriais. A natureza altamente subjetiva da dor é um dos fatores que dificulta a sua compreensão e tratamento clínico (BASBAUM *et al.*, 2000).

Uma distinção entre dor e nocicepção se faz necessária, pois o termo nocicepção refere-se somente à percepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de

um tecido danificado (FÜRST, 1999). Por outro lado, a dor envolve tanto o componente sensorial, quanto o emocional normalmente associado aos quadros dolorosos (COUTAUX *et al.*, 2005).

A transmissão da dor envolve ainda uma complexa interação de estruturas periféricas e centrais, desde a superfície da pele até o córtex cerebral. O sinal nociceptivo está sujeito a uma variedade de modulações facilitatórias e inibitórias, do nociceptor até as estruturas cerebrais envolvidas na percepção e cognição da dor (BROMM & LORENZ, 1998; FÜRST, 1999).

As terminações periféricas sensoriais livres, encontradas em todas as partes do corpo, têm a função de transmitir o sinal nociceptivo da periferia para os neurônios secundários do corno dorsal e através das vias ascendentes da medula espinhal, levar as informações para os centros integradores do SNC (DRAY & PERKINS, 1997; MILLAN, 1999; URBAN & GEBHART, 1999).

As fibras que inervam as regiões da cabeça e corpo, por exemplo, provêm de corpos celulares do gânglio das raízes dorsais (GRD), e podem ser classificadas em três principais grupos baseados nos critérios anatômicos e funcionais (DJOUHRI *et al.*, 1998): a) os corpos celulares de grande diâmetro são características das fibras sensoriais primárias  $A\alpha$  e  $A\beta$ , mielinizadas, e de rápida condução, responsáveis pela informação proprioceptiva (toque leve e pressão); b) os corpos celulares de pequeno e médio diâmetro são características da maior parte dos nociceptores, incluindo os polimodais. Estes são ativados por diferentes estímulos mecânicos, químicos e térmicos de alta intensidade e compreendem as fibras C amielínicas de condução lenta (aproximadamente 0,5-2 m/s); e c) as fibras  $A\delta$  mielinizadas de rápida condução (aproximadamente 5-30 m/s). Várias evidências demonstram que os nociceptores  $A\delta$  e C medeiam, respectivamente, a hiperalgesia primária e secundária, evocadas por

estímulos nocivos (DRAY & PERKINS, 1997; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; RAJA *et al.*, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001). As fibras nociceptivas aferentes C e A $\delta$  podem ser ativadas por vários estímulos locais potencialmente nocivos e substâncias químicas geradas pelo dano tecidual. Esta ativação é transmitida diretamente através das vias aferentes para três sistemas na medula espinhal. O primeiro é o da substância gelatinosa (lâmina II do corno dorsal), o qual modula os padrões aferentes antes de influenciar o segundo sistema espinhal, que são células de transmissão das lâminas III, IV e V do corno dorsal. O terceiro sistema é o das fibras da coluna dorsal, que se projetam para estruturas de níveis superiores do sistema nervoso, como córtex, tálamo e estruturas do sistema límbico. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna do córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO & BROSE, 1998). A via da dor descrita acima, representa o caminho clássico, mas existem diferentes vias possíveis, envolvendo outras estruturas nervosas (BESSON, 1999; JABBUR & SAADE, 1999). Além disso, o trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e à ponte rostral fazendo sinapses em complexos nucleares, incluindo o núcleo magno da rafe (NMR) e o núcleo reticular gigantocelular (NRG). A estimulação dessas estruturas ativa as fibras eferentes descendentes, que favorecem a modulação da entrada de sinal nociceptivo (MENSE, 1993; MELZACK & WALL, 1994; PLEUVRY & LAUETTI, 1996; FÜRST, 1999).

A duração do episódio de dor pode ser transitório, agudo ou crônico. No processo crônico, a dor é causada por um dano tecidual ou por uma patologia, sendo também mantida por outros fatores metabólicos envolvidos que não os gerados no início do processo doloroso. Na dor aguda ocorre dano e ativação dos nociceptores na

região envolvida com a lesão. No tipo transitório, não ocorre qualquer dano tecidual, porém outros fatores podem ativar os nociceptores (MILLAN, 1999). A dor aguda normalmente dura menos que um mês. No entanto, algumas vezes ela pode permanecer por até seis meses, ou mesmo, tornar-se crônica rapidamente (CARR & GOUDAS, 1999). A dor também pode ser classificada de acordo com os neurotransmissores e/ou tipo de lesão em “neurogênica”, “neuropática”, “nociceptiva” ou “psicogênica” e está respectivamente, associada com lesão neural, disfunção neural, ativação aumentada dos nociceptores ou fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

Várias evidências sugerem que a hiperexcitabilidade e descargas ectópicas dos aferentes nociceptivos primários levam a hipernocicepção (alodínia, hiperalgesia ou dor espontânea) devido ao aumento da atividade de uma variedade de canais iônicos (HAINS *et al.*, 2003).

### **1.1 ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS PARA O CONTROLE DA DOR**

Vários trabalhos demonstraram que o processo inflamatório está intimamente relacionado com a manifestação da dor (DRAY *et al.*, 1994; DRAY, 1997; MILLAN, 1999). O processo inflamatório ocorre como uma resposta do tecido à lesão celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado. Ele pode manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, como físico (queimadura, radiação, trauma), biológico (microorganismo, reações imunológicas) ou químico (substância cáustica) (DRAY *et al.*, 1994; DRAY, 1997; MILLAN, 1999). Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (VANE &

BOTTING, 1995; MILLAN, 1999). A estimulação de nociceptores aferentes primários, produz um reflexo axônico local, resultando na liberação de neuropeptídeos, particularmente, substância P (SP), neurocinina A (NKA) e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Estes mediadores contribuem para uma maior estimulação do processo inflamatório e intensificação da nocicepção (COUTAUX *et al.*, 2005). A substância P liberada produz degranulação dos mastócitos, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma, aumento da produção e liberação de enzimas lisossômicas, liberação de prostaglandinas e de interleucina-1 e interleucina-6 (McMAHON *et al.*, 2005). Além disso, este neuropeptídeo também induz a síntese de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular, causando vasodilatação e extravasamento de mediadores inflamatórios para os tecidos e dessa forma estimula e sensibiliza os nociceptores de terminais nervosos (McMAHON *et al.*, 2005).

Dois grupos de mediadores inflamatórios são igualmente importantes na transmissão nociceptiva: aqueles que promovem uma sensibilização dos nociceptores (hiperalgesia) e os que ativam os nociceptores sensibilizados. As citocinas e as prostaglandinas seriam os principais representantes do primeiro grupo, e as cininas (bradicinina) e os neuropeptídeos (SP, NKA e CGRP) do segundo (MILLAN, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000 a,b). As drogas analgésicas com mecanismo de ação sobre os mediadores inflamatórios estariam atuando em duas etapas fundamentais do ciclo destes neurotransmissores: inibindo a produção e/ou liberação do mediador ou bloqueando os receptores ativados por eles. Em ambas as situações eles estariam prevenindo ou bloqueando a ativação do nociceptor previamente sensibilizado (MILLAN, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000 a,b). Com esta finalidade tem sido investigada a ação antinociceptiva de antagonistas das prostaglandinas, dos receptores

B2 da bradicinina, da interleucina-1 $\beta$  e das neurocininas, incluindo a substância P (FERREIRA *et al.*, 1988; GANET *et al.*, 1991; LEVINE & TAIWO, 1994;; MILLAN, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000 a,b)

Uma outra possibilidade é o desenvolvimento de fármacos com ação inibitória sobre enzimas específicas envolvidas na síntese dos mediadores inflamatórios, como as fosfolipases, lipooxigenases, ciclooxigenases-2 (COX-2) e calicreínas (LEVINE & TAIWO, 1994; MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001). Também constituem importantes alvos de ação de drogas analgésicas e antiinflamatórias, a inibição da formação do AMPc e da ativação das proteínas quinases intracelulares, ou ainda a ativação do sistema arginina-óxido nítrico-GMPc. Desse modo, as drogas opióides conhecidas por ativar uma proteína G inibitória (Gi) causam uma redução intracelular de AMPc. Isto resulta em antinocicepção em tecidos inflamados e inibe a hiperalgesia periférica (STEIN *et al.*, 1989; GRUBB, 1998; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999).

## 1.2 CANAIS IÔNICOS

Como ocorre em outras células excitáveis, os neurônios sensoriais expressam uma diversidade de canais iônicos. Os canais iônicos encontrados na membrana celular são de dois tipos: os canais iônicos operados por receptores e os dependentes de voltagem. O canal iônico operado por receptores é um complexo formado por um receptor e um canal iônico que constitui parte integrante de uma proteína com vários domínios transmembrana, como os receptores colinérgicos nicotínicos, gabaérgicos, NMDA e outros. Os canais iônicos dependentes de voltagem se abrem ou fecham, com a variação da voltagem do potencial da membrana. Estes canais são representados pelos canais iônicos clássicos, como os canais de sódio, potássio e cálcio. A

sensibilidade desses canais à voltagem é devida à presença de regiões eletrocarregadas da proteína do canal (MILLAN, 1999). Várias drogas analgésicas causam uma regulação decrescente ou dessensibilização destes receptores alterando a permeabilidade iônica da membrana neuronal, conseqüentemente reduzindo a excitabilidade pós-sináptica.

Os anestésicos locais bloqueiam a condução do impulso na membrana dos aferentes da dor através do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem. A efetividade terapêutica de anticonvulsivantes (carbamazepina e fenitoína), anestésicos locais (lidocaína e tocinida) e antiarrítmicos (mexiletina) no tratamento de determinados tipos de dor, particularmente da dor neuropática e da neuralgia do trigêmio, se deve provavelmente, ao bloqueio dos canais de sódio (RANG & URBAN, 1995; CATTERALL & MACKIE, 1996; MILLAN, 1999). Os neurônios sensoriais nociceptivos sob condições normais expressam pelo menos dois tipos distintos de canais de sódio. O primeiro, sensível a tetrodoxina, é rapidamente ativado e encontrado em todos os neurônios sensoriais. O segundo, resistente a tetrodoxina, é lentamente ativado e encontrado somente em células de pequeno diâmetro e de condução lenta, que incluem os nociceptores polimodais (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999).

A hiperpolarização da membrana provocada pela abertura dos canais de potássio inibe a excitabilidade neuronal e poderia resultar em analgesia (MILLAN, 1999). Entre os diversos tipos de canais de potássio, os que parecem estar envolvidos na fisiopatologia da dor são os dependentes de cálcio e os ATP-sensíveis (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999). Assim, os ativadores dos canais de potássio poderiam ser uma alternativa promissora como novas drogas analgésicas (RANG & URBAN, 1995; MILLAN, 1999).



### 1.3 CÁLCIO ( $\text{Ca}^{2+}$ )

Os íons cálcio são reconhecidos pelo seu papel fundamental na regulação de vários processos biológicos. As mudanças transitórias na concentração destes íons no citoplasma representam um passo crucial na liberação de neurotransmissores e na modulação da excitabilidade da membrana celular (ZAMPONI & SNUYCH, 1998; PRADO, 2001; GALEOTTI *et al.*, 2004). O íon cálcio atua como um segundo mensageiro essencial em diversas vias de sinalização intracelular, apesar de que em níveis aumentados por longo tempo, podem levar à morte celular (CLAPHAM, 1995; SPITZER *et al.*, 2005). Os níveis intracelulares de cálcio (~100 nM) são até 20.000 vezes menores que os níveis de cálcio extracelular (2 mM) (KHANNA *et al.*, 1988). A manutenção deste gradiente depende de diversos fatores relacionados com a movimentação do íon na membrana plasmática e de organelas que são capazes de armazenar o cálcio. A concentração de cálcio intracelular é controlada pela captação e liberação através de três sistemas de membranas: mitocondrial, retículo endoplasmático e plasmática. Cada uma destas membranas possui distintos mecanismos, que atuam modulando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Para manter a homeostasia do cálcio através da redução dos níveis citoplasmáticos, as membranas plasmáticas e as organelas dispõem de um sistema regulatório que bombeia o cálcio para fora do citoplasma (KHANNA *et al.*, 1988; PETERSEN *et al.*, 1994; RAVENS *et al.*, 2004). Na membrana plasmática existem pelo menos dois tipos de bombas dependentes de ATP que bombeiam o cálcio para fora da célula. A primeira é o trocador de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ , que utiliza um gradiente de  $\text{Na}^+$  através da membrana (mantido pela atividade da bomba de  $\text{Na}^+$ ) para dirigir o efluxo de cálcio. O segundo mecanismo

é a bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, que é caracterizada por ter baixa capacidade e alta afinidade de provocar o efluxo do íon cálcio (PETERSEN *et al.*, 1994; RAVENS *et al.*, 2004).

O aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ocorrer através de duas vias principais: 1) pela liberação de cálcio de reservatórios intracelulares, como o retículo endoplasmático; 2) pelo influxo de cálcio extracelular através de membrana plasmática, via abertura de canais (CLAPHAM, 1995; TAYLOR, 2002). A liberação de cálcio de estoques intracelulares é mediada, principalmente, pelo inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). Este sinalizador é produzido através da hidrólise de fosfolipídeos de membrana catalisada pela fosfolipase C. Duas classes de receptores estão envolvidas neste mecanismo: receptor acoplado a proteína G e o de tirosina quinase. Estes receptores, quando ativados por ligantes, ativam fosfolipase C que converte fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato em  $\text{IP}_3$  e diacilglicerol. O  $\text{IP}_3$  atua em receptores de membrana no retículo endoplasmático induzindo a liberação de cálcio destes estoques (CLAPHAM, 1995; NAHORSKI *et al.*, 2003). O influxo de cálcio extracelular através de canais localizados na membrana plasmática também contribui para elevação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). O influxo de cálcio ocorre de três maneiras: a) por canais de cálcio operados por voltagem, que são abertos pela despolarização da membrana, b) por canais de cálcio ativados por ligantes não-específicos; e c) canais de cálcio ativados por receptores (BARRITT, 1999; PRADO, 2001). Nas células não excitáveis, a hiperpolarização da membrana plasmática (através da abertura de canais de  $\text{K}^+$ ) torna o potencial elétrico da célula mais negativo e conseqüentemente ocorre a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  a favor de um gradiente eletroquímico. A presença de canais de cálcio dependentes da voltagem nas células excitáveis, permite o aumento dos níveis citosólicos de cálcio muito mais rapidamente. Nestas células, uma despolarização de membrana induz mudanças conformacionais (“abertura”) nos canais de cálcio-

dependentes de voltagem, que catalizam a entrada de cálcio na célula (CLAPHAM, 1995; TAYLOR, 2002 ).

#### 1.4 CANAIS DE CÁLCIO E NOCICEPÇÃO

Os canais de cálcio consistem em complexos hetero-oligoméricos contendo subunidades  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  funcionalmente estabilizadas por uma subunidade  $\alpha 1$  central, que forma o poro iônico (HOSEY & LAZDUNSKI, 1988; ARIKKATH & CAMPBELL, 2003; BIRCH *et al.*, 2004). Os vários tipos de canais de cálcio são caracterizados por diferenças nos mecanismos que governam a abertura e o fechamento destes canais (HOSEY & LAZDUNSKI, 1988; ARIKKATH & CAMPBELL, 2003; BIRCH *et al.*, 2004). Alguns canais são dependentes da voltagem e a abertura acontece em resposta a uma alteração do potencial elétrico existente através da membrana plasmática. Outros canais são abertos em resposta à ativação de receptores associados a canais de membrana (HOSEY & LAZDUNSKI, 1988; TAYLOR, 2002; DOERING & ZAMPONI, 2003).

Nos anos de 1970 e 1980, quando os fisiologistas utilizavam o termo corrente ao invés de canal, a classificação dos canais de cálcio era baseada nas propriedades da corrente e na sua farmacologia (ERTEL *et al.*, 2000). A classificação mais recente leva em conta a análise da sequência dos genes da subunidade  $\alpha 1$  (ERTEL *et al.*, 2000). A corrente do tipo L (longa duração – alta voltagem) é inibida por derivados de dihidropiridinas. Este tipo é chamado  $\text{Ca}_v1$  e inclui os canais  $\alpha 1S$  (muscular),  $\alpha 1C$  (cardíaco),  $\alpha 1D$  (neuronal) e  $\alpha 1F$  (fotorreceptor). Uma outra corrente de longa duração – alta voltagem, inibida por  $\omega$ -CgTX GVIA foi chamada tipo N (neuronal) (NOWYCK *et al.*, 1985). Nas células de Purkinje, a corrente foi chamada do tipo P e é

bloqueada por baixas concentrações de  $\omega$ -AgaTX IVA. A parte da corrente bloqueada por altas concentrações de  $\omega$ -AgaTX IVA foi chamada do tipo Q (próxima letra depois do P). Os canais de cálcio tipo P e Q são isoformas do gene da subunidade  $\alpha 1A$  (BOURINET *et al.*, 1999). A corrente residual que não pode ser inibida pelo três bloqueadores foi chamada do tipo R (resistente). O tipo T (transitório, em oposição a corrente de longa duração) é ativado por baixa voltagem (ERTEL *et al.*, 2000; VAJNA *et al.*, 2001; DOERING & ZAMPONI, 2003). Os canais de cálcio dependentes de voltagem podem ser classificados como rápidos (tipo L, N, P/Q e R) e lentos (tipo T).

Os canais de cálcio do tipo L são altamente distribuídos nos tecidos excitáveis, principalmente no coração, músculo liso e esquelético e em muitas células não excitáveis. Estes canais controlam a liberação de hormônios em células endócrinas e de neurotransmissores em neurônios (CATTERALL *et al.*, 2003). Três classes de fármacos se ligam à estrutura dos canais do tipo L: as fenilalquilaminas, os benzodiazepínicos e as dihidropiridinas. Estas drogas se ligam a sítios diferentes do receptor, específicos para cada classe. A ligação destes fármacos é alostérica, inibindo a ligação das demais classes de drogas (HOCKERMAN *et al.*, 1997).

Os canais de cálcio do tipo T apresentam características eletrofisiológicas que os diferenciam facilmente dos demais. Eles são ativados por baixa voltagem, abrindo-se em potenciais muito negativos. A baixa condutância e a lenta cinética de desativação são as propriedades biofísicas mais marcantes destes canais (DAVILA, 1999).

Os canais de cálcio dos tipos L, N e T da membrana neuronal contribuem para a excitabilidade de neurônios sensoriais (PRADO, 2001; HEINKE *et al.*, 2004). Os canais N e L podem ser bloqueados pelas dihidropiridinas e por neurotransmissores como os opióides, GABA e o neuropeptídeo Y. Estes bloqueadores de canais N e L

impedem a sinalização nociceptiva na medula espinhal e modificam a excitabilidade em terminais de neurônios periféricos (DRAY, 1995; MILLAN, 1999; KOCHEGAROV, 2003; MURAKAMI *et al.*, 2004).

Vários autores discutem o envolvimento dos íons cálcio na regulação de diferentes processos biológicos, como a excitabilidade das membranas, nocicepção e antinocicepção (ZAMPONI & SNUTCH, 1998; PRADO, 2001; GALEOTTI *et al.*, 2004; HEINKE *et al.*, 2004). Como o controle dos níveis intracelulares deste íon pode ser mediado e regulado pelos canais de cálcio, substâncias que modulam a ação destes canais têm sido investigadas no estudo da nocicepção e antinocicepção.

A administração de 5-hidroxitriptofano (5-HT) produziu efeito antinociceptivo, no teste da placa quente em camundongos (LIANG *et al.*, 2004). Estes autores demonstraram que este efeito foi relacionado com a inibição do influxo de cálcio do meio extracelular através de canais de cálcio tipo L. Compostos bloqueadores de canais de cálcio do tipo L (nifedipina, nimodipina e verapamil) potencializaram a antinocicepção induzida pelo 5-HT (LIANG *et al.*, 2004). O efeito antinociceptivo dos opióides também foi potencializado pela flunarizina, nimodipine e nicardipine, antagonistas dos canais de cálcio do tipo L (PRADO, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2004).

Os canais de cálcio do tipo P/Q e N medeiam a transmissão sináptica rápida nas sinapses químicas. Os canais do tipo N e provavelmente os canais do tipo P, participam na modulação da informação nociceptiva, enquanto o envolvimento dos canais do tipo L parece ser bem restrito (PRADO, 2001; MURAKAMI *et al.*, 2004). Os canais de cálcio do tipo L parecem ser mais importantes na regulação de eventos dependentes do cálcio celular do que na neurotransmissão (PRADO, 2001).

Os canais do tipo N estão presentes no terminal pré-sináptico de neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal, onde eles regulam a liberação de

neurotransmissores pró-nociceptivos como o glutamato e a substância P (WEN *et al.*, 2005). Recentemente foi encontrada em neurônios nociceptivos do glânglio da raiz dorsal, uma isoforma do canal do tipo N, o que poderia ser um novo alvo para o controle da dor (WEN *et al.*, 2005).

Vários experimentos realizados com diferentes antagonistas de canais de cálcio dependentes de voltagem revelaram que os canais dos tipos L, N, P/Q e T estão envolvidos na nocicepção (PRADO, 2001; BOURINET *et al.*, 2005).

### 1.5 PROTEÍNA QUINASE C (PKC) E NOCICEPÇÃO

A proteína quinase C (PKC) é uma família de proteínas quinase serina – treonina ativadas por lipídeos e cálcio, com um importante papel na transdução de sinais intracelulares (NISHIZUKA, 1984; PARKER & DEKKER, 1997; POOLE *et al.*, 2004; PARKER & MURRAY, 2004).

As diferentes isoformas da PKC são classificadas em três subfamílias, de acordo com o domínio regulatório N-terminal (KISHI & RANDO, 1998; PARKER & MURRAY, 2004). Este domínio determina a sensibilidade para os segundo mensageiros cálcio e diacilglicerol (DAG). As isoenzimas da PKC,  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II e  $\gamma$  requerem DAG, fosfatidilserina (PS) e cálcio para a sua ativação. As PKC  $\eta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  requerem DAG, PS e cálcio para a sua ativação. As PKC  $\zeta$ ,  $\lambda$  e  $\iota$  não requerem nem cálcio nem DAG (RANDO & KISHI, 1998; PARKER & MURRAY, 2004).

A ligação da PKC ao cálcio e ao DAG é apenas um dos mecanismos regulatórios desta proteína quinase. A fosforilação em resíduos de serina, treonina e tirosina são essenciais para a maturação e ativação das PKCs (NEWTON, 2003). A

ligação de um estímulo num receptor tirosina quinase ou ligado à proteína G ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC cliva o fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato em inositol 1,4,5 trifosfato ( $IP_3$ ) e DAG. O  $IP_3$  atua em receptores de membrana no retículo endoplasmático, induzindo a liberação de cálcio destes estoques. A seguir, o DAG e o cálcio ativam a PKC (GOEKJAN & JIROUSEK, 1999; TAYLOR & LAUDE, 2002). Finalmente, a PKC fosforila suas proteínas alvo produzindo mudanças transcricionais e pós-traducionais, as quais produzem respostas fisiológicas como a percepção da dor (JI & WOOLF, 2001).

A ativação de proteínas quinases pode ser responsável pela produção de sensibilização central, a qual se manifesta como um aumento da responsividade para estímulos inócuos/nocivos, e a propagação da sensibilidade dolorosa para além da área da injúria tecidual e o desenvolvimento de dor em resposta a estímulos de baixa intensidade (WOOLF, 1983).

A PKC presente na medula espinhal está envolvida nos mecanismos de alodínia e hiperalgesia e no desenvolvimento de tolerância aos efeitos analgésicos da morfina (MALMBERG *et al.*, 1997b, YAJIMA *et al.*, 2003). Camundongos PKC- $\gamma$  mutantes não se tornaram tolerantes aos efeitos da morfina como os camundongos selvagens (ZEITZ *et al.*, 2001). MAO *et al.*, (1995) verificaram que a injúria nervosa em ratos aumenta a expressão da PKC-c no corno dorsal da medula espinhal. A ligação do nervo ciático em camundongos também aumentou os níveis da PKC- $\gamma$  na medula e isto foi associado com uma hiperalgesia térmica (YAJIMA *et al.*, 2003).

A isoenzima PKC- $\epsilon$  contribui para a sensibilização induzida por bradicinina dos nociceptores do coração (CESARE *et al.*, 1999). ZHOU *et al.*, (2001) demonstraram que esta proteína quinase é expressa em neurônios do glânglio da raiz dorsal e está intrinsicamente envolvida na nocicepção.

## 1.6 BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO

As variações na expressão de canais iônicos fazem parte da plasticidade neuronal e proporcionam um mecanismo para as células nervosas responderem às mudanças no seu ambiente. Alterações inapropriadas na expressão e distribuição de canais iônicos ou uma disfunção na sua atividade contribuem para a hiperexcitabilidade neuronal e podem ser os principais fatores para o desenvolvimento e manutenção de processos patológicos (BIRCH *et al.*, 2004). Drogas que modulam a função dos canais iônicos têm sido usadas no tratamento terapêutico de epilepsia, hipertensão, diabetes e dor crônica (GILL *et al.*, 2003).

A flunarizina é um derivado piperazínico não seletivo, antagonista dos canais de cálcio dependentes de voltagem dos tipos T e L (MONTIEL *et al.*, 1997). Este composto tem sido utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares e neurológicas, bem como na profilaxia e tratamento da enxaqueca (DIENER, 1994; KOCHEGAROV, 2003). A flunarizina também apresenta ação anticonvulsivante em humanos e animais (BEBIN & BLECK, 1994; KOCHEGAROV, 2003). DEL POZZO *et al.* (1987) e CONTRERAS *et al.* (1988) foram os primeiros autores a demonstrar que a flunarizina induzia antinocicepção no modelo do ácido acético e no teste da placa quente, respectivamente. Posteriormente, a flunarizina demonstrou um efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético (MIRANDA *et al.*, 1993), no teste da formalina e da retirada da cauda em camundongos (VERMA *et al.*, 2000; VERMA *et al.*, 2001). A analgesia da flunarizina parece ser mediada pelos subtipos  $\mu 1$  e  $\mu 2$  do receptor opióide (WEIZMAN *et al.*, 1999).



Apesar do uso terapêutico da flunarizina na enxaqueca, seu uso prolongado pode provocar efeitos colaterais indesejados (sintomas extrapiramidais) (FABIANI *et al.*, 2004). Estes efeitos ocorrem pelo acúmulo da flunarizina em tecidos cerebrais, associado com um efeito antagonista de receptores dopaminérgicos (FABIANI *et al.*, 2004). TORT *et al.*, (2005) sugerem o possível uso da flunarizina como antipsicótico, no tratamento da esquizofrenia. O baixo custo, a ótima tolerabilidade e a longa meia-vida (superior a duas semanas) são vantagens da flunarizina em relação a outros antipsicóticos (TORT *et al.*, 2005). Além disso, a flunarizina também demonstrou uma ação citoprotetora em células em culturas (MAROTO *et al.*, 1994; SO *et al.*, 2005).

A dotarizina é um derivado piperazínico análogo da flunarizina e também possui possíveis propriedades anti-enxaqueca (NOVALBOS *et al.*, 1999; RUIZ-NUNO *et al.*, 2001) e antinociceptivas (BELCHEVA *et al.*, 1995). Devido à sua capacidade de bloquear os diferentes subtipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , L, N, P/Q, a dotarizina também apresentou efeito citoprotetor (CANO-ABAD *et al.*, 2000). Além disso, este composto exibe potente atividade antihistamínica e antiserotonérgica, *in vitro* e *in vivo* (KURIDZE *et al.*, 2000).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os íons cálcio desempenham um papel fundamental na regulação de vários processos biológicos. As mudanças transitórias na concentração dos íons cálcio no citoplasma representam um passo crucial na liberação de neurotransmissores e na modulação da excitabilidade da membrana celular. Mais recentemente, vários autores têm discutido o envolvimento deste íon na nocicepção, antinocicepção e no efeito analgésico produzido por opióides (ZAMPONI & SNUYCH, 1998; PRADO, 2001; GALEOTTI *et al.*, 2004).

Drogas que modulam a função dos canais iônicos têm sido usadas no tratamento terapêutico de epilepsia, hipertensão, diabetes e dor crônica (GILL *et al.*, 2003). O controle da dor é um aspecto essencial na medicina moderna e para a qualidade de vida. Apesar do grande número de substâncias analgésicas e antiinflamatórias disponíveis atualmente para uso clínico, a terapêutica da dor ainda necessita de fármacos com maior especificidade, menor toxicidade e com indicação para modalidades de dor ainda de difícil tratamento, como as de origem neurogênicas (MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001; BIRCH *et al.*, 2004).

O conhecimento da fisiopatologia da dor, com a identificação precisa dos mediadores inflamatórios liberados e seus mecanismos moleculares, é de fundamental importância no desenvolvimento das drogas analgésicas de maior seletividade e menor toxicidade. Os estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na transmissão e percepção da dor, poderiam auxiliar uma melhor compreensão das vias nociceptivas.

Diante do exposto, torna-se necessário ampliar os conhecimentos sobre o efeito de bloqueadores de canais de cálcio, como a dotarizina e flunarizina, no mecanismo de

controle da dor. Além disso, várias drogas que reduzem o influxo de cálcio nos neurônios têm sido indicadas como analgésicos alternativos aos opióides (PRADO, 2001; BIRCH *et al.*, 2004). Em estudo recente, RODRIGUES (2005) demonstrou que a dotarizina e a flunarizina produziram um efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção química, induzidos por ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato. O efeito antinociceptivo envolveu a participação de canais de cálcio dependentes de voltagem e da proteína  $G_{i/o}$ .

### **3. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi investigar a ação antinociceptiva da flunarizina e da dotarizina utilizando modelos de dor inflamatória e neuropática em camundongos.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar os efeitos antinociceptivos da dotarizina e flunarizina na alodínia mecânica induzida pela injeção intraplantar de epinefrina e prostaglandina em camundongos;
- Verificar a atividade antinociceptiva da dotarizina e flunarizina na dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático em camundongos;
- Verificar a atividade antinociceptiva da dotarizina e flunarizina na alodínia mecânica induzida pela injeção intraplantar de adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos;
- Verificar a atividade antinociceptiva da dotarizina e flunarizina na nocicepção inflamatória induzida pela injeção intraplantar de PMA em camundongos;
- Verificar o possível efeito depressor dos compostos dotarizina e flunarizina sobre o sistema nervoso central ou periférico, através do teste em “rota rod”.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

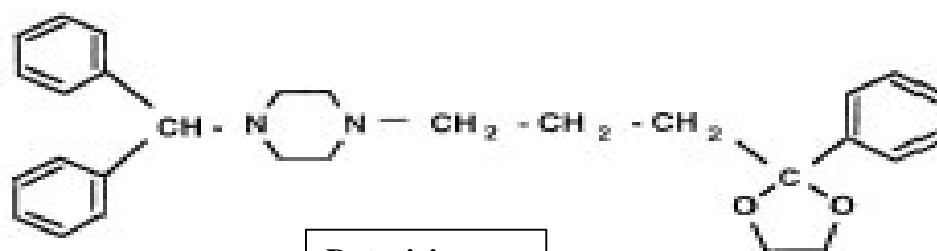
### 4.1. Drogas

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes drogas:

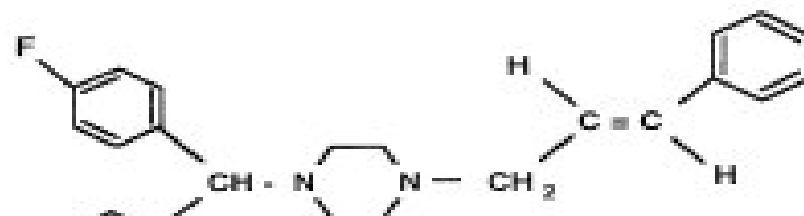
- Flunarizina – é um derivado piperazínico produzido pelo Laboratório Janssen Research (Beerse, Bélgica).
- Dotarizina – análogo da flunarizina é também um derivado piperazínico, produzido pelo Laboratório Ferrer (Barcelona, Espanha).

Estas drogas foram fornecidas pelos Drs. Antônio G. Garcia e Manuela G. Lopez, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Autônoma de Madrid (Madrid, Espanha).

Epinefrina, prostaglandina ( $\text{PGE}_2$ ), CFA (Adjuvante completo de Freund), PMA (éster de forbol, um ativador de PKC) da Sigma (St. Louis, MO, USA);



Dotarizina



Flunarizina

**Figura 1. Estrutura química da dotarizina e flunarizina**

#### 4.2. ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos “Swiss”, machos e fêmeas pesando entre 25-30 g com 60-80 dias de idade. Os camundongos tinham livre acesso à água e comida, e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00 às 19:00 h) em temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas. Todas as observações foram feitas entre 08:00 e 18:00 horas e os animais permaneciam no laboratório por um período de adaptação de pelo menos uma semana. Os experimento foram conduzidos de acordo com orientações para cuidados com animais de laboratório e

considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Assim, o número de animais empregado e os estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos procedimentos cirúrgicos, tratamentos com drogas ou manipulações.

Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações aprovadas pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA), UFSC.

### **4.3 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO**

#### **4.3.1 BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO**

A flunarizina e a dotarizina foram utilizadas na dose de 30 mg/kg de peso, administradas pela via intraperitoneal (i.p.), de acordo com os dados obtidos por RODRIGUES (2005). Nos experimentos de nocicepção induzida por PMA, a dotarizina e flunarizina foram utilizadas nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, de peso, i.p.

#### **4.3.2 DROGAS INDUTORAS DE NOCICEPÇÃO**

- Epinefrina - foi administrada pela via intraplantar (100 ng por sítio) num volume de 20 µl (KHASAR *et al.*, 1999).

- Prostaglandina - foi administrada pela via intraplantar (100 ng por sítio) num volume de 20 µl (KHASAR *et al.*, 1999).

- Adjuvante completo de Freund (CFA) - foi administrado pela via intraplantar num volume de 20 µl (1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inativado, diluído em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato de manida) (20 µl/pata direita).

- PMA - (éster de forbol) um ativador de PKC. A solução "stock" de PMA foi preparada em etanol absoluto (1 mM) e posteriormente diluída em salina. A injeção de

PMA foi administrada pela via intraplantar (0,03 µg) num volume de 20 µl (SIEBEL et al., 2004).

#### **4.4 AVALIAÇÃO DA HIPERNOCICEPÇÃO (ALODÍNIA MECÂNICA) ATRAVÉS DO FILAMENTO DE VON FREY**

A alodínia mecânica foi avaliada utilizando os filamentos de von Frey (0,02 – 4g; Stoelting, EUA) (DIXON, 1980). Os camundongos foram colocados em compartimentos de acrílico (7 x 9 x11 cm) sobre uma tela de metal e aclimatizados por, no mínimo, 1,5 horas antes do teste. O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente a superfície plantar dos animais. Foram analisadas as respostas em relação à tensão-resposta aos vários filamentos (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0 e 4,0g) que por sua vez produzem diferentes graus de estimulação mecânica (inócua ou nociva). As sessões começavam com a aplicação do filamento 0,4g, caso a tensão-resposta fosse nociva, utilizava-se um filamento com menor valor em (g) subsequente. Porém, se a tensão resposta fosse inócua, testava-se o filamento com maior valor subsequente em (g) a partir da última resposta. Os filamentos de von Frey foram aplicados por seis sessões e a retirada da pata foi registrada como a porcentagem das respostas. Os filamentos foram padronizados de acordo com os pesos reais em gramas (g) medidos através de uma balança de precisão e sua média logarítmica (Tabela 1)



**Tabela 1.** Peso em (g) dos filamentos de von Frey.

| Peso em (g)<br>aparente dos<br>filamentos | Peso em (g)<br>real dos<br>filamentos | Logarítmo do<br>peso real dos<br>filamentos (log) | Médias (log)<br>entre os<br>filamentos |
|---|---------------------------------------|---|--|
| 0,02                                      | 0,016 ⇒                               | 1,204   | 0,02 e 0,04<br>0,305                   |
| 0,04                                      | 0,032 ⇒                               | 1,505   | 0,04 e 0,07<br>0,304                   |
| 0,07                                      | 0,065 ⇒                               | 1,813   | 0,07 e 0,16<br>0,333                   |
| 0,16                                      | 0,14 ⇒                                | 2,146   | 0,16 e 0,4<br>0,331                    |
| 0,4                                       | 0,3 ⇒                                 | 2,477   | 0,4 e 1,0<br>0,431                     |
| 1,0                                       | 0,81 ⇒                                | 2,908   | 1,0 e 2,0<br>0,296                     |
| 2,0                                       | 1,60 ⇒                                | 3,204   | 2,0 e 4,0<br>0,301                     |
| 4,0                                       | 3,20 ⇒                                | 3,505   |  |

Média geral dos filamentos = 0,325

A fórmula utilizada para avaliar o limiar 50% no modelo de alodínia mecânica (filamento de von Frey) é:

$$\text{Limiar 50\%} = \text{log do último fio} - (k \cdot \text{Média})$$

Sendo que:

- **log do último fio** = significa o valor do logarítmo do último fio utilizado na série de seis aplicações na análise do filamento do von Frey.
- **K** = constante baseada no modelo de resposta, utilizada na Tabela 2. (DIXON, 1980).
- **Média** = média logarítmica entre todos os filamentos, que pela Tabela 1, corresponde a um valor constante de: **0,325**.

#### **4.5 ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA PELA EPINEFRINA E PROSTAGLANDINA**

Os animais receberam injeção na pata direita de epinefrina ou prostaglandina (100 ng por sítio) num volume de 20 µl, administrada pela via intraplantar (KHASAR *et al.*, 1999). A alodínia mecânica foi avaliada pelos filamentos de von Frey, em diferentes intervalos de tempo, como descrito no item 4.4.

Para verificar o efeito antinociceptivo da dotarizina e flunarizina, os animais receberam salina (10 ml/kg de peso), dotarizina (30 mg/kg) ou flunarizina (30 mg/kg), pela via intraperitoneal. Depois de 30 minutos, os animais foram administrados pela via intraplantar com 20 µl de epinefrina ou prostaglandina (100 ng por sítio). A alodínia mecânica foi avaliada em diferentes intervalos de tempo como descrito no item 4.4.

#### **4.6 ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA POR LESÃO PARCIAL DO NERVO CIÁTICO (DOR NEUROPÁTICA)**

Os animais foram anestesiados pela administração de hidrato de cloral a 7% (10 ml/Kg, i.p.). A seguir, foi feita uma pequena incisão na região da coxa, na musculatura entre o ilíaco e o músculo glúteo, sendo divulsionado, exposto e dissecado o nervo ciático próximo à trifurcação ciática, das veias e dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos por SELTZER *et al.* (1990), e adaptada para camundongos por MALMBERG & BASBAUM (1998). Com uma agulha de fio cirúrgico 8-0, o nervo ciático foi ligado em volta de aproximadamente 1/3 a 1/2 da porção dorsal e amarrado três vezes. Um grupo de animais “falso operados”, o nervo foi exposto, mas não amarrado.

Após sete dias, diferentes grupos de animais operados receberam salina (10 ml/Kg, i.p.), flunarizina (30 mg/kg, i.p.) ou dotarizina (30 mg/kg, i.p.). O grupo “falso operado” recebeu salina (10 ml/kg, i.p.). Após 30 minutos foi realizado o experimento. A alodínia mecânica, conforme descrito no item 4.4, em diferentes intervalos de tempo, foi avaliada utilizando os filamentos de von Frey.

#### **4.7 ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)**

Os animais foram levemente anestesiados com éter e receberam injeção intraplantar (20 µl) de salina (controle) ou CFA (1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inativado, diluído em 85% de óleo de parafina e 15% de monoleato de manida) na pata direita (FERREIRA *et al*, 2002). Após 24 horas, os animais foram injetados com salina (10 ml/kg, i.p.), dotarizina ou flunarizina (doses de 30 mg/kg, i.p.). A alodínia mecânica foi avaliada utilizando os filamentos de von Frey como descrito no item 4.4 em diferentes intervalos de tempo.

#### **4.8 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR PMA**

Os animais foram tratados com salina, dotarizina (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) ou flunarizina (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos, os animais receberam injeção intraplantar de PMA (ativador de PKC, 0,03 µg/pata, 20 µl) de acordo com o método descrito por SIEBEL *et al*. (2004). A seguir, os animais foram imediatamente colocados em um cilindro de vidro (20 cm de diâmetro). Depois de 15 minutos, os animais foram observados durante 30 minutos. O tempo (em segundos) que o animal

permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada ("licking") durante este período foi registrado com um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção.

#### **4.9 AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE MOTORA (TESTE DO “ROTA-ROD”)**

Com o objetivo de verificar um possível efeito depressor da dotarizina e flunarizina sobre o sistema nervoso central ou periférico, os animais foram submetidos ao teste do “rota-rod”, que analisa a performance motora (DUHAM & MIYA, 1957; AHMAD & NICHOLLS, 1990). O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividido em 4 compartimentos girando a 17 r.p.m, colocada a 16 cm de altura. Animais foram selecionados e colocados sobre a haste giratória do aparelho de “rota-rod”, girando a 17 r.p.m. durante dois períodos consecutivos de 60 segundos. Os camundongos que não permaneceram sobre o aparelho foram eliminados, não sendo utilizados no experimento descrito a seguir. Após 24 horas, os animais selecionados no dia anterior ( $n = 6/\text{grupo}$ ), foram injetados (i.p.) com salina (10 ml/kg de peso), flunarizina ou dotarizina nas doses utilizadas neste trabalho (3, 10 e 30 mg/kg). Após 30 minutos, os animais foram novamente submetidos ao teste de "rota-rod" e avaliado o tempo de permanência sobre a haste giratória durante 60 segundos. Os dados foram armazenados por um programa de computador elaborado pelo Engenheiro Carlos Antônio Sell da Fundação CERTI (Florianópolis-SC).

#### **4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de  $DI_{50}$  (doses de dotarizina e flunarizina que reduziram as

respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como as médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman Keuls. Valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como indicativos de significância. Os valores de  $DI_{50}$  foram obtidos através do método de regressão linear. Para a análise estatística utilizou-se o software Graph Pad InStat<sup>®</sup> (1994, San Diego, CA) versão 2.05.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA POR EPINEFRINA E PROSTAGLANDINA

Neste experimento foi verificada a indução de alodínia mecânica induzida pela administração dos mediadores epinefrina e prostaglandina. Nas Figuras 2A e 2B podem ser observados os efeitos da administração de epinefrina (100 ng/sítio em 20 µl) e prostaglandina (PgE<sub>2</sub>) (100 ng/sítio em 20 µl) na pata direita (ipsilateral), quando comparados com os grupos controle (20 µl/sítio de salina 0,9%) em uma análise temporal. A epinefrina e a prostaglandina induziram um aumento de 74% e 49% respectivamente, na frequência de retirada de patas, no tempo de 10 minutos. Ambas as drogas mostraram um rápido efeito nociceptivo, 10 minutos após sua administração, que perdurou até 60 minutos após sua administração. Além disso, pode-se observar que a alodínia induzida pela epinefrina foi maior quando comparada a induzida pela prostaglandina (Figuras 2A e 2B). Os dados mostrados nas Figuras 2A e 2B também mostram que a epinefrina e a prostaglandina foram capazes de induzir alodínia mecânica na pata ipsilateral (Figuras 2A e 2B) e não na pata contralateral (Figuras 3A e 3B) quando comparados ao grupo controle.

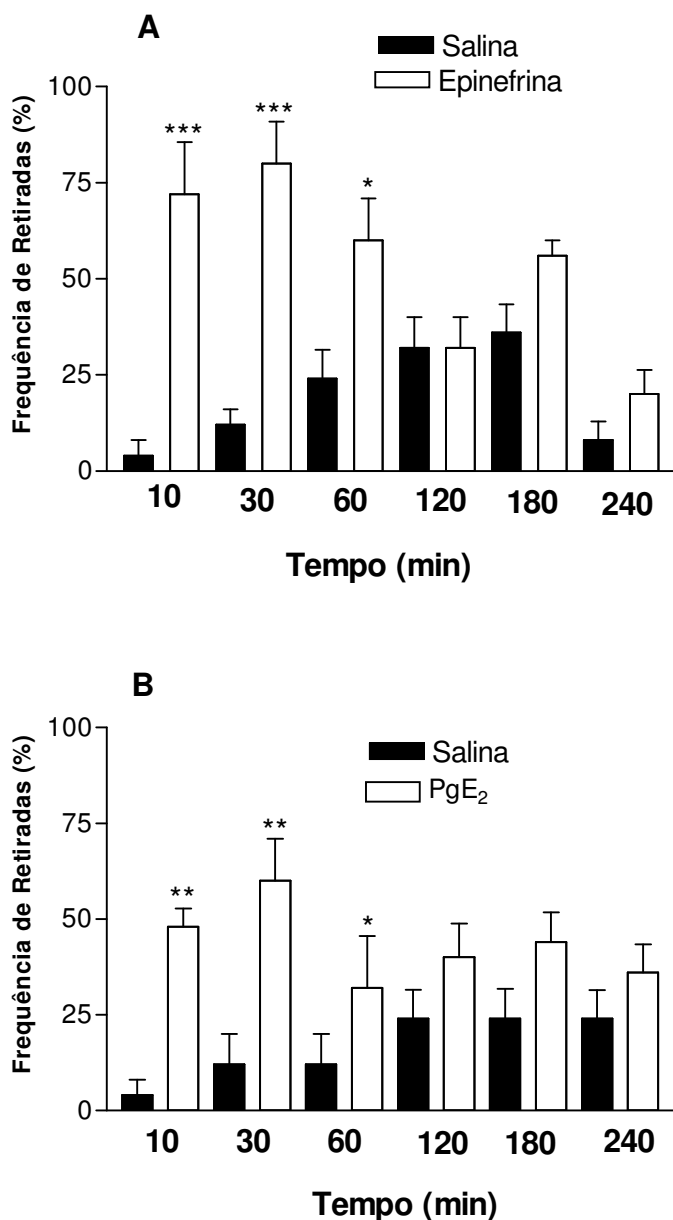


Figura 2 – Efeito da administração de epinefrina (A) ou prostaglandina (B, PgE<sub>2</sub>) na alodínia mecânica na pata direita. Epinefrina ou prostaglandina (100 ng/sítio, 20 µl) foram injetados na pata direita (ipsilateral). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 representam o nível de significância dos animais tratados com epinefrina ou prostaglandina, quando comparados com os salina (controle) (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

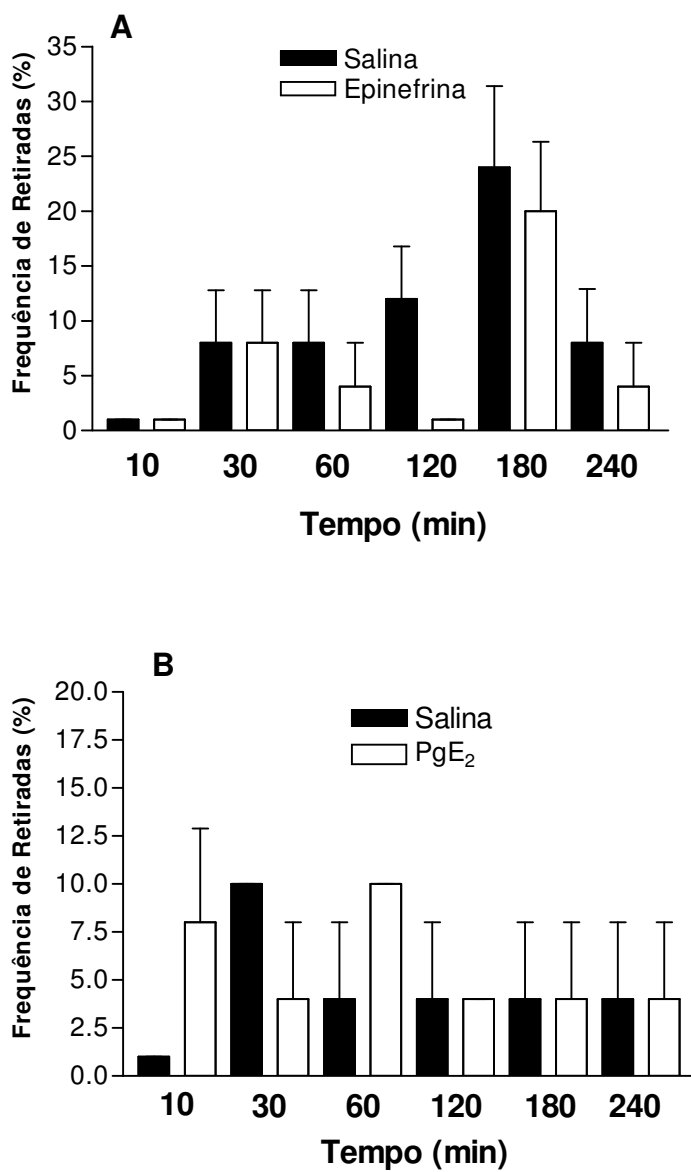


Figura 3 – Alodínia mecânica avaliada na pata esquerda (contralateral) causada pela administração de epinefrina (100 ng/sítio, 20  $\mu$ l) (A) ou prostaglandina (PgE<sub>2</sub>) (100 ng/sítio, 20  $\mu$ l) na pata direita (ipsilateral) (B). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais.



## **5.2 EFEITO DA DOTARIZINA E FLUNARIZINA NA ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA PELA EPINEFRINA**

Na Figura 4 pode ser observada que o grupo de animais que recebeu epinefrina na pata e salina (via i.p.) apresentou maior alodínia mecânica (menor limiar de resposta) quando analisado pelos filamentos de von Frey. Após 30 minutos, a dotarizina e a flunarizina reduziram de forma significativa ( $61 \pm 23 \%$  e  $100\%$ , respectivamente) a alodínia mecânica induzida pela epinefrina. A ação antinociceptiva foi mantida por até 120 minutos, quando a flunarizina ainda mostrou uma inibição de  $78 \pm 25\%$ . Neste tempo, também a dotarizina alcançou seu pico de atividade antinociceptiva, reduzindo a alodínia mecânica em  $77 \pm 26 \%$ . A flunarizina e a dotarizina deixaram de exercer atividade antinociceptiva a partir do tempo de 360 e 240 minutos, respectivamente. Neste modelo, a flunarizina foi mais efetiva do que a dotarizina em reduzir a alodínia mecânica induzida pela epinefrina.

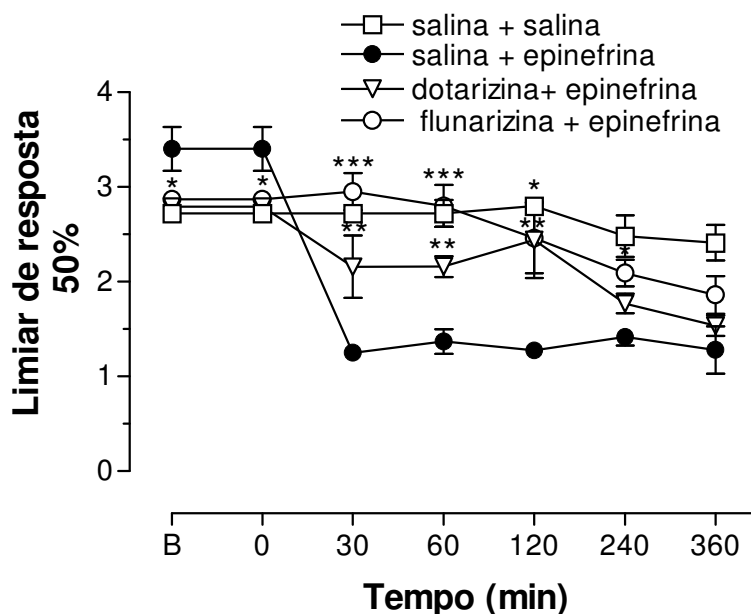


Figura 4 - Efeito da dotarizina e da flunarizina na alodínia mecânica, dependente do tempo, causada pela injeção de epinefrina (100 ng/sítio em 20 $\mu$ l) na pata direita (ipsilateral). Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais. B = Basal. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , representam o nível de significância dos animais tratados com as drogas dotarizina mais epinefrina e flunarizina mais epinefrina, quando comparados com animais tratados com salina mais epinefrina (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls).

### 5.3. EFEITO DA DOTARIZINA E FLUNARIZINA NA ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA POR PROSTAGLANDINA

Na Figura 5 pode ser observada a alodínia mecânica induzida pela prostaglandina ( $\text{PgE}_2$ ). O grupo que recebeu prostaglandina na pata e salina (via i.p.) apresentou maior alodínia mecânica (limiar de resposta menor) quando analisado por filamentos de von Frey, em comparação aos grupos tratados tanto com a dotarizina como a flunarizina. Além disso, pode ser observado que a dotarizina e a flunarizina foram capazes de reduzir a alodínia mecânica, induzida pela prostaglandina, de forma significativa, com porcentagem de inibição de  $49 \pm 5 \%$  e  $47 \pm 8 \%$ , respectivamente, nos primeiros 30 minutos, mantendo suas ações antinociceptivas, de forma significativa, até 120 minutos. No entanto, em 60 minutos, a dotarizina foi mais efetiva que a flunarizina, com porcentagem de inibição de  $74 \pm 25 \%$ . A dotarizina alcançou seu pico de atividade antinociceptiva no tempo 120 minutos onde reverteu totalmente (100%) a alodínia mecânica induzida pela prostaglandina. A flunarizina e a dotarizina deixaram de exercer atividade antinociceptiva no tempo 240 minutos.

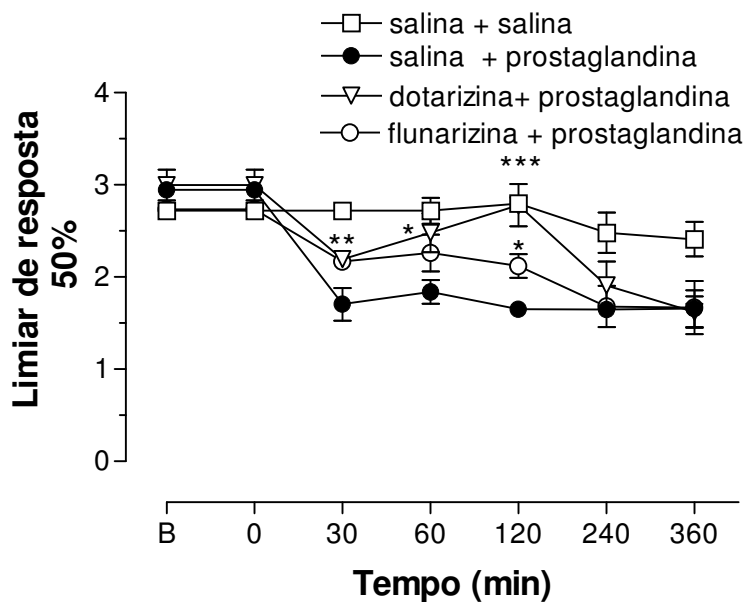


Figura 5 - Efeito da dotarizina e da flunarizina na alodínia mecânica, dependente do tempo, causada por prostaglandina ( $\text{PgE}_2$ ) (100 ng/sítio em 20 $\mu\text{l}$ ) na pata direita (ipsilateral). Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais. B = Basal. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , representam o nível de significância dos animais tratados com as drogas dotarizina mais  $\text{PgE}_2$  e flunarizina mais  $\text{PgE}_2$ , quando comparados com animais tratados com salina mais  $\text{PgE}_2$  (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls).

#### 5.4 EFEITO DA DOTARIZINA E DA FLUNARIZINA NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

Como está apresentado nas Figuras 6A e 6B, a ligação parcial do nervo ciático produziu uma diminuição no limiar de nocicepção caracterizado pela alodínia mecânica na pata ipsilateral, avaliada pela aplicação do filamento de von Frey, quando comparado com o grupo falso-operado. O procedimento cirúrgico não alterou o limiar de resposta das patas contralaterais dos animais operados e falso-operados (dados não mostrados). A administração de dotarizina e flunarizina foi capaz de reduzir, de forma significativa a alodínia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático, com inibição de  $42 \pm 15$  e  $32 \pm 13$  % observada em 60 e 30 minutos após a administração de dotarizina e flunarizina, respectivamente (Figuras 6A e 6B).

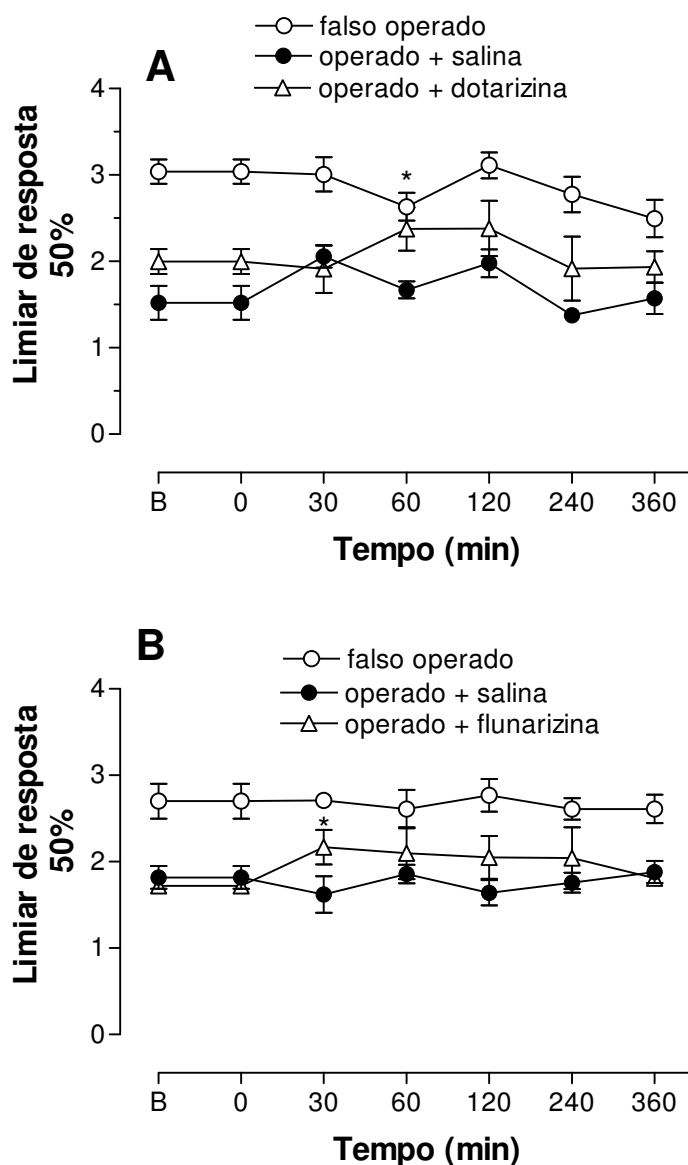


Figura 6 – Efeito da dotarizina (A) e da flunarizina (B) na alodínia mecânica produzida pela lesão parcial do nervo ciático direito de camundongos. Animais operados receberam salina (10 ml/kg, i.p.), flunarizina (30 mg/kg, i.p.) ou dotarizina (30 mg/kg, i.p.). O grupo “falso operado” recebeu salina (10 ml/kg, i.p.). Após 30 minutos foi realizada a avaliação. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais. B = Basal. \* $P < 0,05$ , representa o nível de significância dos animais tratados com dotarizina ou flunarizina quando comparados com os animais operados + salina (controle). (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls).

### **5.5 EFEITO DA DOTARIZINA E DA FLUNARIZINA NA ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DO CFA**

Após 24 h da administração intraplantar de CFA pata direita, pode ser observado um intenso processo inflamatório, o qual, produziu uma alodínia mecânica de longa duração em camundongos. Como mostrado na Figura 7, essa alodínia foi caracterizada por significativo aumento na retirada das patas quando em presença de estímulos mecânicos (filamentos de von Frey) em uma análise temporal.

A alodínia mecânica foi observada durante todo o tempo de experimento, no grupo CFA com salina. Porém, foi observado significativo efeito antinociceptivo quando da administração da flunarizina e da dotarizina. Neste sentido, tanto a dotarizina quanto a flunarizina apresentaram marcante redução na alodínia ( $86 \pm 13 \%$  e  $64 \pm 6 \%$ , respectivamente) causada pelo CFA nos primeiros 30 minutos. A dotarizina reverteu completamente (100%) a alodínia no tempo de 60 minutos, enquanto a flunarizina foi capaz de reduzir em  $61 \pm 22 \%$ . Além disso, após o tempo de 60 minutos da administração de dotarizina e de flunarizina não observou-se mais efeito antinociceptivo.

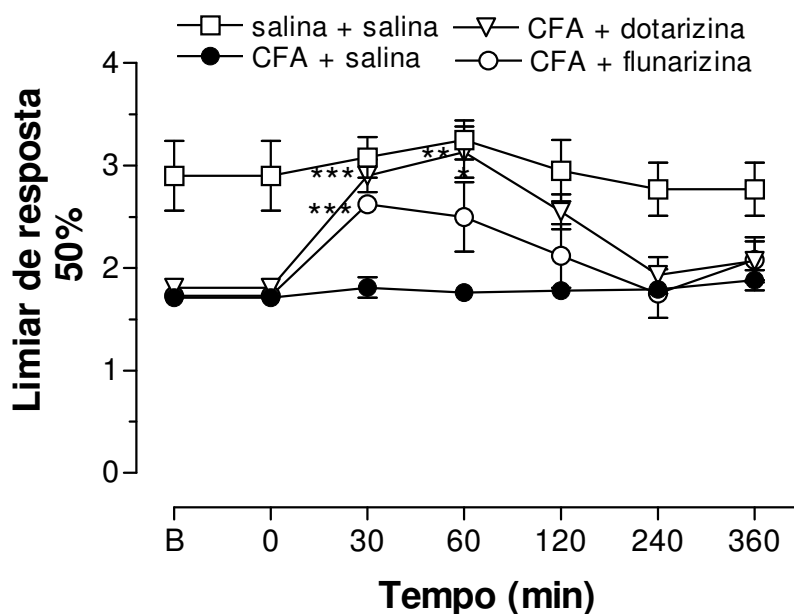


Figura 7- Efeito da dotarizina e da flunarizina na alodínia mecânica induzida pelo CFA na pata direita, B = basal. Os animais receberam salina ou CFA. Após 24 horas, os animais foram injetados com salina (10 mg/kg, i.p.), dotarizina ou flunarizina (30 mg/kg, i.p.) Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais. B = Basal. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  representam o nível de significância dos animais tratados com dotarizina e flunarizina, quando comparados aos animais tratados com CFA e salina (ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post hoc* de Newman-Keuls).



## 5.6 EFEITO DA DOTARIZINA E DA FLUNARIZINA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE PMA

O tempo que o animal permaneceu lambendo (“licking”) a pata injetada foi indicativo de que o PMA foi capaz de estimular os nociceptores. Pode ser observado na Figura 8A, que o pré-tratamento dos camundongos com dotarizina nas doses de 10 e 30 mg/kg (i.p.) reduziu de modo significativo e dependente da dose, a nocicepção induzida pelo PMA (0,03 µg/pata), apresentando uma  $DI_{50}$  (dose inibitória que reduz as respostas nociceptivas em 50% em relação ao controle) de 25,7 (23,3-28,4) mg/kg. Um resultado semelhante (Figura 8B) também foi observado para a flunarizina nas doses de 10 e 30 mg/kg (i.p.), apresentando uma  $DI_{50}$  de 28,0 (24,1-32,7) mg/kg. Nas doses de 30 mg/kg, de dotarizina e flunarizina, a inibição foi de  $53 \pm 5\%$  e  $52 \pm 3\%$ , respectivamente.

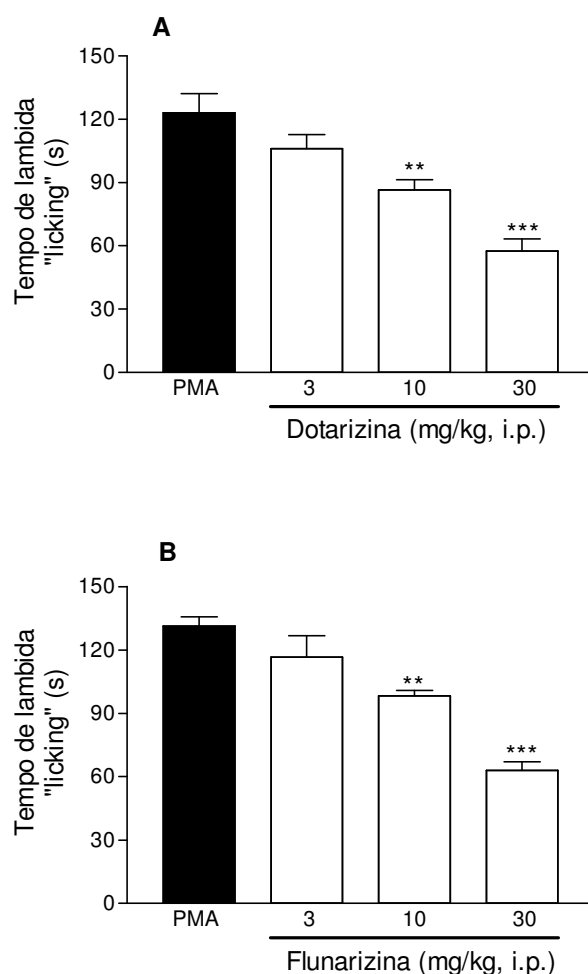


Figura 8- Efeito da dotarizina (A) e da flunarizina (B) na nociceção induzida pelo PMA na pata direita (ipsilateral). Os animais foram tratados com salina, dotarizina ou flunarizina (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.) e após 30 minutos, os animais receberam PMA (0,03 µg/pata, i.pl.). Após 15 minutos, o comportamento de lambida (“licking”) da pata injetada foi observado durante 30 minutos. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  representam o nível de significância dos animais tratados com dotarizina mais PMA ou flunarizina mais PMA, quando comparados aos animais tratados com salina mais PMA. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls).

## **5.7 EFEITO DA DOTARIZINA E DA FLUNARIZINA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA**

### **(TESTE DO “ROTA-ROD”)**

Animais previamente selecionados, foram injetados (i.p.) com salina (10 ml/kg), dotarizina ou flunarizina nas doses de (3, 10 e 30 mg/kg). Após 30 minutos, foi avaliado durante 60 segundos, o tempo em que os animais permaneciam sobre a haste giratória, no teste do “rota-rod”. As Figuras 9 A e 9B mostram que a administração de dotarizina e a flunarizina nas doses testadas, não alterou a performance motora dos animais no teste do “rota rod”. Os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo da dotarizina e da flunarizina parece não estar associado diretamente a alterações motoras ou sedativas.

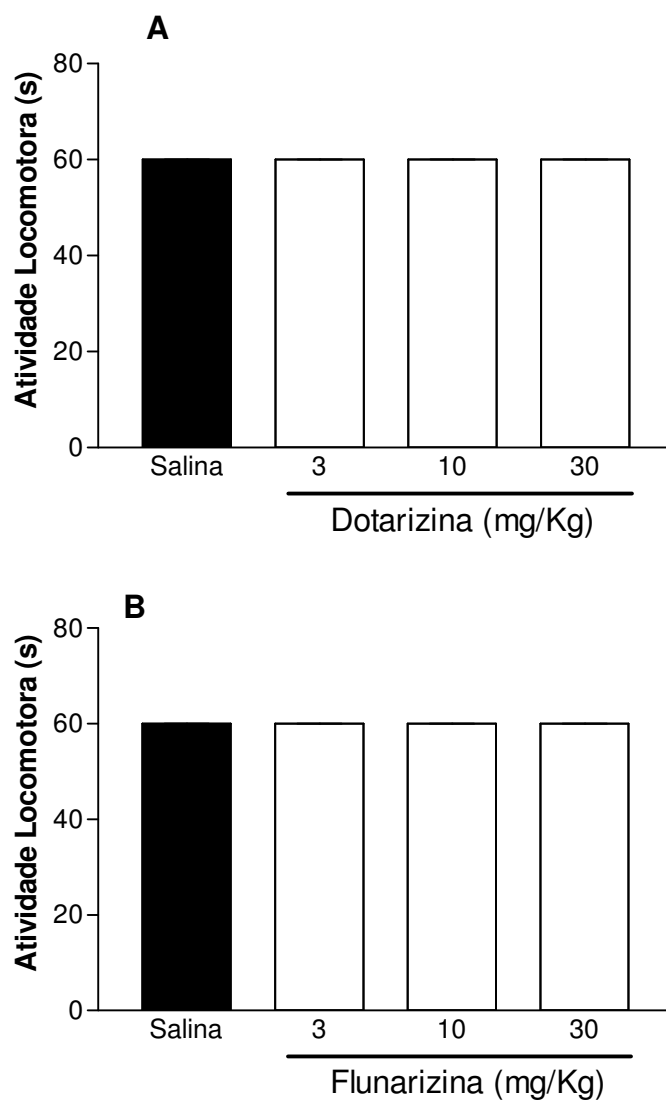


Figura 9 - Efeito do tratamento dos animais com dotarizina (A) ou flunarizina (B) nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg (i.p.) na atividade locomotora de camundongos avaliados no teste do “rota rod”, durante 60 segundos. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão de 6 animais.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou uma ação antinociceptiva de dois bloqueadores de canais de cálcio, a dotarizina e a flunarizina, em modelos de dor inflamatória e neuropática em camundongos. Dados preliminares, obtidos por RODRIGUES (2005) demonstraram que a administração sistêmica de dotarizina e flunarizina provocava um efeito antinociceptivo em camundongos. Neste estudo, estes compostos mostraram um efeito antinociceptivo em vários modelos de nocicepção química, induzidos por ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato. Este autor sugere que os efeitos observados foram devido a mecanismos que envolviam a interação com a proteína  $G_{i/o}$  e canais de cálcio dependentes de voltagem (RODRIGUES, 2005).

Um número expressivo de modelos de nocicepção em animais de laboratório podem ser utilizados para verificar a atividade analgésica de compostos. No entanto, de uma maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como sua simplicidade, reprodutibilidade e viabilidade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos.

Dentre os vários modelos de nocicepção utilizando animais de laboratório, estão a ligação parcial do nervo ciático e a nocicepção persistente causada pela injeção de epinefrina, prostaglandina ou CFA. Ambas, a dor neuropática e a dor inflamatória provocam hipersensibilidade no local do dano tecidual e também em tecidos adjacentes normais dando origem aos fenômenos conhecidos como hipernocicepção, caracterizada pela hiperalgesia e pela alodínia.

Lesões em tecidos periféricos, como pele, articulações e vísceras, levam à liberação de vários mediadores pró-inflamatórios que podem ativar e sensibilizar nociceptores para outros estímulos. A ativação dos nociceptores na periferia segue com a mobilização do cálcio intracelular e extracelular e ativação da proteína quinase C, principalmente a do tipo  $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) (CESARE *et al.*, 1999; DRAY & PERKINS, 1997; JULIUS & BASBAUM, 2001). Esta ativação produz sinais que convergem para o corno dorsal da medula espinhal, a qual processa a informação nociceptiva e a projeta para várias estruturas supraespinhais. Em locais como tálamo, hipocampo, amígdala, córtex cerebral e substância cinzenta periaquedutal ocorrem os processos de percepção, aprendizado, proteção e controle endógeno da dor (WOOLF & SALTER, 2000; CRAIG, 2003).

A nocicepção persistente causada pela administração intraplantar de CFA é um modelo de nocicepção amplamente utilizado. A administração de CFA na cauda ou nas patas de ratos, camundongos ou coelhos produz um processo inflamatório intenso, que se desenvolve rapidamente e pode persistir por várias semanas (BILLIAU & MATTHYS, 2001). A administração de CFA produz reação inflamatória local caracterizada por eritema, aumento da temperatura local, extravasamento plasmático, infiltração de células inflamatórias, associado com a produção de vários mediadores inflamatórios e nociceptivos tais como citocinas, neurotrofinas e eicosanóides (GANJU *et al.*, 2001). Na nocicepção induzida por CFA, o receptor de cinina B<sub>1</sub> exerce um papel crucial na manutenção da hiperalgesia inflamatória persistente. O receptor B<sub>2</sub> parece ter apenas um papel menor, na amplificação do estágio inicial da formação de edema (FERREIRA *et al.*, 2001).

Na hiperalgesia inflamatória persistente induzida por CFA foi demonstrada a participação da caseína quinase 2 (LI *et al.*, 2005) e da quinase regulada por sinal

extracelular (ERK) (JI *et al.*, 2002a; GALAN *et al.*, 2002). Esta ativação também tem sido observado por despolarização da membrana e influxo de cálcio (ROSEN *et al.*, 1994), na dor neuropática (CIRUELA *et al.*, 2003; GALAN *et al.*, 2003) e na hiperalgesia inflamatória. Assim, as respostas nociceptivas nestes modelos podem ser prevenidos ou reduzidos por inibidores da ERK (JI *et al.*, 2002a). GALAN *et al.* (2002) mostraram evidências sobre o papel das ERKs no processamento nociceptivo na medula espinhal em modelos de dor somática.

A injeção intraplantar de CFA em animais constitui um modelo de dor inflamatória que tem similaridade com doenças crônicas humanas tais como artrite reumatóide e as inflamações severas nas articulações (TJOLSEN & HOLE, 1997; SHENKER *et al.*, 2001). Em consequência, a injeção de CFA causa hiperalgesia e alodínia, que é mediada pela sensibilização local do nociceptor e por mecanismos sistêmicos neurais (como a sensibilização central) e imunes (como o aumento dos níveis locais e séricos de citocinas) (WOOLF *et al.*, 1997; SAMAD *et al.*, 2001).

Vários estudos têm demonstrado que compostos com ação de bloqueadores de canais de cálcio, como os derivados das diidropiridinas, fenilalquilaminas, difenilalquilaminas, antibióticos aminoglicosídeos e toxinas animais apresentam atividade antinociceptiva em diferentes modelos de nocicepção (PRADO, 2001; KOCHGAROV, 2003), além de atividade anticonvulsivante e citoprotetora (BINNIE, 1989; BEBIN & BLECK, 1994; KUROKI *et al.*, 1996; SERRA *et al.*, 1998; LOIKKANEN & SAVOLAINEN, 2003).

A dotarizina e a flunarizina são bloqueadores de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) do tipo L, N e P/Q e do tipo L e T, respectivamente. Estudos anteriores demonstraram que estes compostos potencializaram a analgesia produzida pela morfina em modelos de nocicepção, além de prevenir o desenvolvimento de

tolerância (VERMA *et al.*, 2001). Nossos resultados mostraram um efeito antinociceptivo da dotarizina e flunarizina no modelo de nocicepção induzida pelo CFA. Este efeito foi observado durante apenas uma hora, sugerindo que isto possa ser devido ao fato de existirem vários mediadores atuando em diferentes vias nociceptivas envolvidas na hipernocicepção (GANJU *et al.*, 2001). Além disso, a curta duração do efeito da dotarizina e a flunarizina provavelmente seria devido à ação específica destes compostos em bloquear apenas os canais de cálcio dependentes de voltagem. Assim, o efeito antinociceptivo destes bloqueadores de canais de cálcio pode estar rapidamente sendo revertido pela entrada de cálcio por outras vias, como o trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , a bomba de cálcio ou pela liberação de cálcio dos depósitos intracelulares (LYDEN & WAHLGREN, 2000). Durante o período (1 hora) em que foi observado o efeito antinociceptivo, a dotarizina foi mais eficiente do que a flunarizina, em inibir a alodínia mecânica no modelo do CFA. Possivelmente, este efeito pode ter ocorrido porque a dotarizina apresenta uma ação menos seletiva do que a flunarizina, bloqueando também os canais do tipo N e P/Q. Os nossos resultados foram semelhantes aos dados obtidos por MALMBERG & YAKSH (1994) utilizando a nocicepção induzida por formalina, também um modelo de nocicepção inflamatória. Estes autores demonstraram que os bloqueadores de canais de cálcio do tipo L também tiveram um efeito reduzido sobre a nocicepção do teste da formalina. Os canais de cálcio do tipo P/Q parecem importantes no início, mas não na manutenção da nocicepção. Entretanto, os canais de cálcio do tipo N participam tanto no início quanto na manutenção da nocicepção (MALMBERG & YAKSH, 1994).

Vários trabalhos sugerem que os canais do tipo N e provavelmente também os canais do tipo P/Q participam na modulação da informação nociceptiva. O



envolvimento dos canais do tipo L no processo parece ser bem restrito (PRADO, 2001; MURAKAMI *et al.*, 2004).

A alodínia mecânica causada por CFA foi inibida pelo extrato de *Phyllanthus amarus* em camundongos (KASSUYA *et al.*, 2003) e pelo ácido ajulêmico canabinóide, em ratos (MITCHELL *et al.*, 2005). De acordo com BURSTEIN *et al.* (2004), um efeito antinociceptivo no modelo do CFA, ocorre pela inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórias, como a ciclo-oxigenase-2, interleucina 1 $\beta$  e a óxido nítrico sintase, via inibição do fator nuclear  $\kappa$ B.

Outro modelo testado, foi a dor neuropática, a qual é produzida por trauma no nervo, através de amarras (BENNETT, 1999b; HOGAN, 2002). Este tipo de dor possui similaridades com a dor inflamatória, pois vários mediadores inflamatórios estão associados à sua manifestação (BENNETT, 1999a). Após a injúria nervosa periférica, ocorre um aumento na concentração citosólica de cálcio nos neurônios da medula. Este influxo de cálcio ativa a cálcio-calmodulina quinase II, a qual, fosforila vários receptores presentes nos neurônios da medula. A fosforilação destes receptores causa uma plasticidade neuronal e contribui para a sensibilização central (FANG *et al.*, 2002).

No presente estudo, a ligação parcial do nervo ciático provocou a redução do limiar nociceptivo (alodínia mecânica) durante todo experimento (6 horas), como haviam demonstrado DECOSTERD *et al.* (2004). A flunarizina e a dotarizina não mostraram uma redução efetiva da nocicepção causada pela ligadura do nervo ciático (dor neuropática). CHAPLAN *et al.* (1994) demonstraram que bloqueadores de canais de cálcio tipo N reduziram a alodínia mecânica causada pela ligadura do nervo ciático. O bloqueio de canais do tipo L e P/Q não teve efeito neste modelo. O reduzido efeito da dotarizina e flunarizina neste modelo, sugere que tivesse ocorrido uma

sensibilização central, acompanhada de plasticidade neuronal. Além disso, outros canais iônicos e receptores podem estar sendo ativados neste processo doloroso. Isto tem sido demonstrado por outras drogas, com ações distintas da dotarizina e da flunarizina, mas que apresentam efeito antinociceptivo no modelo de dor neuropática. Por exemplo, compostos antidepressivos e antiepiléticos também apresentam efeito antinociceptivo na dor neuropática (DWORKIN *et al.*, 2003). Além disso, compostos bloqueadores de canais de cálcio do tipo T (DOGRUL *et al.*, 2003) e do tipo N (TEODORI *et al.*, 2004) demonstraram um efeito antinociceptivo em modelos de dor neuropática. A nocicepção no modelo de dor neuropática também pode ser reduzido pela administração sistêmica de drogas agonistas dos receptores GABA (A) (RODE *et al.*, 2005) e dos receptores canabinóides CB1 e CB2 (MITCHELL *et al.*, 2005).

Também foi verificada, a possível ação modulatória da dotarizina e da flunarizina, na hipernocicepção causada pela administração de epinefrina. A injeção de epinefrina causa hipernocicepção (alodínia mecânica) pela ativação direta dos nociceptores primários por um mecanismo dependente da ativação da proteína quinase C (PKC) e da proteína quinase A (PKA) (KHASAR *et al.*, 1999).

A epinefrina e os agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos, clonidina e UK 14,304, quando co-injetados com o ionóforo de cálcio A23187 produziram uma hiperalgisia dependente da dose em ratos. Essa hiperalgisia foi antagonizada por antagonistas do receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico (KHASAR *et al.*, 1995). Além disso, tem sido mostrado que a injeção intradermal de epinefrina na pata, produz uma hiperalgisia, por ação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos aferentes primários (ALEY *et al.*, 2001). A epinefrina ao ativar receptores  $\beta$ -adrenérgicos, aumenta o influxo de cálcio através de canais de cálcio tipo L, em células do gânglio da raiz dorsal (GRD) (ABDULLA & SMITH, 1997). Quando a epinefrina ativa receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ocorre uma inibição do

influxo de cálcio através de canais de cálcio tipo N. Como as células GRD podem estar envolvidas na transmissão da informação nociceptiva, mudanças no acoplamento entre os canais de cálcio e os adrenoreceptores podem contribuir para a etiologia da nocicepção (ABDULLA & SMITH, 1997).

Nossos dados confirmam e estendem os resultados publicados na literatura, pois o tratamento dos animais com a flunarizina e dotarizina, bloqueadores de canais de cálcio tipo L, inibiu a nocicepção causada pela epinefrina. Além disso, a flunarizina (bloqueia apenas canais L) foi mais eficaz em inibir a nocicepção induzida pela epinefrina do que a dotarizina (bloqueador não específico de canais de cálcio tipo L, N e P/Q). Este resultado sugere que a epinefrina ativou os receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos e com isso favoreceu o influxo de cálcio por canais do tipo L, ao invés dos outros tipos.

A ação antinociceptiva da dotarizina e da flunarizina também foi verificada nas respostas induzidas pela administração de prostaglandina ( $PGE_2$ ). Estudos autoradiográficos demonstraram que a  $PGE_2$  se liga preferencialmente, em receptores localizados no corno dorsal superficial (MATSUMURA *et al.*, 1995). A  $PGE_2$  é um mediador inflamatório que aumenta a liberação de glutamato dos aferentes primário e estimula a liberação de neuropeptídeos em culturas de neurônios do glânglio da raiz dorsal (FERREIRA *et al.*, 1996).

Estudos comportamentais sugerem que a prostaglandina facilita a transmissão nociceptiva na medula, contribuindo para a sensibilização central (NAKAYAMA *et al.*, 2002). A  $PGE_2$  ativa diferentes vias de segundo mensageiro, através de sua interação com receptores acoplados a proteína G. Dentre estes receptores, a ativação do receptor  $EP_1$ , causa um influxo de cálcio, que resulta no aumento da concentração do cálcio intracelular (COLEMAN *et al.*, 1994). MINAMI *et al.*, (1994) demonstraram

que o composto ONO-NT-012, um antagonista EP<sub>1</sub> bloqueou a alodínia induzida pela administração intratecal de PGE<sub>2</sub> em camundongos. Além disso, outros antagonistas destes receptores inibiram o aumento da concentração de cálcio citosólico induzido pela PGE<sub>2</sub>, o que resultou em inibição da alodínia mecânica (OMOTE *et al.*, 2002). Segundo NAKAYAMA *et al.* (2004), o efeito nociceptivo da PGE<sub>2</sub> seria mediado pelos receptores EP<sub>1</sub>. A inibição do efeito nociceptivo da prostaglandina pelos bloqueadores dotarizina e flunarizina, confirmam a importância do influxo de cálcio através dos canais do tipo L, neste modelo de nocicepção. Entretanto, o maior efeito inibitório demonstrado pela dotarizina, sugere também a participação (influxo de cálcio) dos canais de cálcio do tipo P/Q e N, na nocicepção induzida pela prostaglandina.

Vários autores sugerem que a alodínia mecânica causada pela PGE<sub>2</sub> pode ser mediada pela estimulação da PKA (MALMBERG *et al.*, 1997a; ALEY & LEVINE, 1999). Diferentes mediadores inflamatórios produzem nocicepção pela sensibilização de fibras sensoriais periféricas e espinhais. Tem sido demonstrado que essa sensibilização resulta da ativação de diferentes cascatas de proteínas quinases, como a PKC, PKA e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que fosforilam receptores e canais iônicos na membrana (JI & WOOLF, 2001; SCHOLZ & WOOLF, 2002). Uma mistura dos triterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina foi capaz de inibir a nocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> (OTUKI *et al.*, 2005). Neste trabalho, os autores demonstraram que o efeito antinociceptivo destes compostos é devido à capacidade de interferir na sinalização celular, inibindo a PKC e PKA, e não por interferir diretamente com o sítio de ligação das prostaglandinas.

Estudos funcionais e moleculares suportam o papel fundamental da PKC na transmissão da dor. Além do efeito de produzir nocicepção, a PKC parece estar também envolvida na tolerância a morfina (GRANADOS-SOTO *et al.*, 2000).

O éster de forbol (PMA) é um derivado de plantas e conhecido ativador da PKC (CASTAGNA *et al.*, 1982). O PMA pode atravessar a membrana plasmática para diretamente se ligar e ativar a PKC no citosol. Entretanto, o PMA não apresenta seletividade para apenas uma isoforma de PKC, o que resulta em ativação de todas as PKC na célula (CASTAGNA *et al.*, 1982). Evidências sugerem que a ativação de PKC por forbol sensibiliza e regula as funções dos nociceptores. Assim, inibidores seletivos de PKC reduziram a resposta nociceptiva induzida pela formalina. (YASHPAL *et al.*, 1995; CESARE & McNAUGHTON, 1996). A estimulação da PKC da região espinhal pelo forbol (PMA) ou por um ativador seletivo produz aumento da nocicepção térmica e da induzida pela formalina em ratos, principalmente com relação à segunda fase deste teste (MALMBERG *et al.*, 1997b; PALECEK *et al.*, 1999).

Os níveis de PKC estão aumentados nos neurônios do corno dorsal após um estímulo nocivo ou injúria nervosa periférica (MAO *et al.*, 1995). O tratamento de camundongos com inibidores de PKC ou a deleção do gene que codifica isoenzimas PKC produzem marcante diminuição na hiperalgesia mecânica e térmica após ligação parcial do nervo ciático ou induzida por adrenalina (KHASAR *et al.*, 1999).

A aplicação intraplantar de PMA em ratos evoca um comportamento nociceptivo semelhante ao produzido pela formalina e pela capsaicina (TANIGUCHI *et al.*, 1997; SIEBEL *et al.*, 2004). No presente estudo foi verificado se o efeito antinociceptivo da dotarizina e da flunarizina estava associado com a inibição dos canais de cálcio ativados pela PKC. Nossos resultados mostraram que a dotarizina e a flunarizina inibiram de forma dependente da dose, a nocicepção induzida por PMA em

camundongos. Portanto, estes dados estão de acordo com MARINO *et al.* (2004), que sugerem que o bloqueio dos canais de cálcio ativados pela proteína quinase C (PKC) inibe a transmissão do estímulo doloroso.

O efeito antinociceptivo observado pela dotarizina e flunarizina parece não estar associado diretamente a alterações motoras ou sedativas. Nas doses em que estes compostos demonstraram antinocicepção, elas não provocaram alteração na performance motora dos animais, quando avaliados no teste do “rota rod”.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho apresentam evidências demonstrando que a dotarizina e a flunarizina exercem um efeito antinociceptivo contra a alodínia mecânica induzida pela epinefrina, prostaglandina, CFA, dor neuropática e pela ativação da PKC. Entretanto, os mecanismos de ação envolvidos na antinocicepção provocada por estes compostos ainda não são bem conhecidos.

Estes resultados fornecem subsídios farmacológicos sobre o mecanismo de ação antinociceptiva da dotarizina e da flunarizina e indicam um possível potencial destes compostos e/ou de seus análogos, no uso terapêutico ou para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

## 7. CONCLUSÕES

- A dotarizina e a flunarizina inibiram a nocicepção causada pela epinefrina. A flunarizina reverteu totalmente a nocicepção neste modelo, sugerindo que os canais de cálcio dos tipos L e T participam na nocicepção induzida pela epinefrina;
- A nocicepção induzida pela prostaglandina foi inibida pela dotarizina e flunarizina, sugerindo que neste modelo de nocicepção há um influxo de cálcio através dos canais dos tipos L, P/Q e N;
- A dotarizina e a flunarizina reduziram parcialmente a nocicepção causada pela ligadura do nervo ciático (dor neuropática), indicando um papel secundário dos canais de cálcio neste modelo;
- A alodínia mecânica induzida por CFA foi inibida de maneira mais efetiva pela dotarizina, sugerindo que os canais de cálcio do tipo L, N e P/Q estão envolvidos neste modelo de nocicepção;
- A antinocicepção induzida pela dotarizina e flunarizina sugere que o bloqueio dos canais de cálcio ativados pela proteína quinase C (PKC) inibe a transmissão do estímulo doloroso.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLA, F.A. & SMITH, P.A. Ectopic alpha2-adrenoceptors couple to N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in axotomized rat sensory neurons. **J. Neurosci.**, **17**:1633-1641, 1997.
- AHMAD, B. & NICHOLLS, P.J. Development of tolerance to the CNS effects of aminogluthethimide in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **182**: 237-244, 1990.
- ALEY, K.O. & LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J. Neurosci.**, **19**: 2181–2186, 1999.
- ALEY, K.O.; McMAHON, T.; MOK, J.; MESSING, R.O. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. **J. Neurosci.**, **21**: 6933-6939, 2001.
- ARIKKATH, J. & CAMPBELL, K.P. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. **Curr. Opin. Neurobiol.**, **13**: 298-307, 2003.
- BARRITT, G.J. Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling requirements. **Biochem. J.**, **337**: 153-169, 1999.
- BASBAUM, A.E.; JESSEL, T.M. The perception of pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles Neural Science**, 4 ed. McGraw-Hill: New York, 472-791, 2000.
- BEBIN, M. & BLECK, T.P. New anticonvulsant drugs. Focus on flunarizine, fosphenytoin, midazolam and stiripentol. **Drugs**, **48**: 153-171, 1994.
- BELCHEVA, S.; PETKOV, V.D.; KONSTANTINOVA, E.; PETKOV, V.V.; BOYANOVA, E. Effects on nociception of the  $\text{Ca}^{2+}$  and 5-HT antagonist dotarizine and other 5-HT receptor agonists and antagonists. **Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.**, **21**: 93-98, 1995.



- BENNETT, G.J. Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **96**: 7737-7738, 1999a.
- BENNETT, G.J. New frontiers in mechanisms and therapy of painful peripheral neuropathies. **Acta Anaesthesiol. Sin.**, **37**: 197-203, 1999b.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet.**, **353**: 1610-1615, 1999.
- BILLIAU, A. & MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **J. Leukoc. Biol.**, **70**: 849-860, 2001.
- BINNIE, C.D. Potential antiepileptic drugs. Flunarizine and other calcium entry blockers. **Antiepileptic Drugs, Raven Press, New York**, 971-982, 1989.
- BIRCH, P.J.; DEKKER, L.V.; JAMES, I.F.; SOUTHAN, A.; CRINK, D. Strategies to identify ion channel modulators: current and novel approaches to target neuropathic pain. **Drug Discov. Today**, **9**: 410-418, 2004.
- BOURINET, E.; SOONG, T.W.; SUTTON, K.; SLAYMAKER, S. Splicing of  $\alpha_{1A}$  subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. **Nat. Neurosci.**, **2**: 407-415, 1999.
- BOURINET, E.; ALLOUI, A.; MONTEIL, A.; BARRERE, C.; COUETTE, B.; POIROT, O.; PAGES, A.; McRORY, J.; SNUTCH, T.P.; ESCHALIER, A.; NARGEOT, J. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. **EMBO J.**, **24**: 315-324, 2005.
- BROMM, B. & LORENZ, J. Neurophysiological evaluation of pain. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.**, **107**: 227-253, 1998.

- BURSTEIN, S.H.; KARST, M.; SCHNEIDER, U.; ZURIER, R.B. Ajulemic acid: a novel cannabinoid produces analgesia without a “high”. **Life Sci.**, **75**: 1513–1522, 2004.
- CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.**, **14**: 401- 418, 2000a.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, **87**: 1-5, 2000b.
- CANO-ABAD, M.F.; GARCIA, A.G.; SANCHEZ-GARCIA, P.; LOPEZ, M.G. Ba<sup>(2+)</sup>-induced chromaffin cell death: cytoprotection by Ca<sup>(2+)</sup> channel antagonists. **Eur. J. Pharmacol.**, **402**: 19-29, 2000.
- CARR, D.B. & GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, **353**: 2051-2058, 1999.
- CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; SANO, K.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **J. Biol. Chem.**, **257**: 7847-7851, 1982.
- CATTERALL, W.A.; STRIESSNIG, J.; SNUTCH, T.P.; PEREZ-REYES, E. International Union of Pharmacology XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. **Pharmacol. Rev.**, **55**: 579-581, 2003.
- CATTERALL, W.A. & MACKIE, K. Local Anesthetics. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB *et al.*, - Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9<sup>th</sup> Ed., New York, McGraw-Hill, 331-347, 1996.
- CESARE, P.; DEKKER, L.V.; SARDINI, A.; PARKER, P.J.; McNAUGHTON, P.A. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**, **23**: 617-624, 1999.

- CESARE, P. & McNAUGHTON, P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**: 15435-15439, 1996.
- CHAPLAN, S.R.; POGREL, J.W.; YAKSH, T.L. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **269**: 1117-1123, 1994.
- CIRUELA, A.; DIXON, A.K.; BRAMWELL, S.; GONZALEZ, M.I.; PINNOCK, R.D.; LEE, K. Identification of MEK1 as novel target for the treatment of neuropathic pain. **Br. J. Pharmacol.**, **138**: 751-756, 2003.
- CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, **80**: 259-268, 1995.
- COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.**, **46**: 205-229, 1994.
- COLOMBINI, N.E.P. Cirurgia do Terço Inferior da Face. **Cirurgia maxilofacial**, 561-577, 1991.
- CONTRERAS, E.; TAMAYO, L.; AMIGO, M. Calcium channel antagonists increase morphine-induced analgesia and antagonize morphine tolerance. **Eur. J. Pharmacol.**, **148**: 463-466, 1988.
- COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 2005 [in press].
- COWAN, D.T.; ALLAN, L.G.; LIBRETO, S.E.; GRIFFITHS, P. Opioid drugs: a comparative survey of therapeutic and "street" use. **Pain Med.**, **2**: 193-203, 2001.

- CRAIG, A.D. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Curr. Opin. Neurobiol.**, **13**: 500-505, 2003.
- DAVILA, H.M. Molecular and functional diversity of voltage-gate calcium channels. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **868**:102-117, 1999.
- DECOSTERD, I.; ALLCHORNE, A.; WOOLF, C.J. Differential analgesic sensitivity of two distinct neuropathic pain models. **Anesth. Analg.**, **99**: 457–463, 2004.
- DEL POZO, E.; CARO, G.; BAEYENS, J.M. Analgesic effects of several calcium channel blockers in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **137**:155- 160, 1987.
- DIENER, H.C. A review of current treatment of migraine. **Eur. Neurol.**, **34**: 18-25, 1994.
- DIXON, W.J. Efficient analysis of experimental observations. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **20**: 441-462, 1980.
- DJOUHRI, L.; BLEAZARD, L.; LAWSON, S.N. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurons. **J. Physiol.**, **513**: 857-872, 1998.
- DOERING, C.J. & ZAMPONI, G.W. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. **J. Bioenerg. Biomembr.**, **35**: 491-505, 2003.
- DOGRUL, A.; GARDELL, L.R.; OSSIPOV, M.H.; TULUNAY, F.C.; LAI, J.; PORRECA, F. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. **Pain**, **105**: 159-168, 2003.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, **75**: 125-131, 1995.
- DRAY, A. Peripheral mediators of pain. In: The pharmacology of pain (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), Springer, Berlin, 21-41, 1997.

- DRAY, A. & PERKINS, M. Kinins and pain. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The Kinin System**. Academic Press: London, 157-172, 1997.
- DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sci.**, **15**: 190-197, 1994.
- DUHAM, N.W. & MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological déficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, **46**: 208-209, 1957.
- DWORKIN, R.H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M.C.; ALLEN, R.R.; ARGOFF, C.R.; BENNETT, G.J.; BUSHNELL, M.C.; FARRAR, J.T.; GALER, B.S.; HAYTHORNTHWAITE, J.A.; HEWITT, D.J.; LOESER, J.D.; MAX, M.B.; SALTARELLI, M.; SCHMADER, K.E.; STEIN, C.; THOMPSON, D.; TURK, D.C.; WALLACE, M.S.; WATKINS, L.R.; WEINSTEIN, S.M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch. Neurol.**, **60**: 1524–1534, 2003.
- ERTEL, E.A.; CAMPBELL, K.P.; HARPOLD, M.M.; HOFMANN, F. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, **25**: 533-535, 2000.
- FABIANI, G.; PASTRO, P.C.; FROEHNER, C. Parkinsonism and other movement disorders in outpatients in chronic use of cinnarizine and flunarizine. **Arq. Neuropsiquiatry**, **62**: 784-788, 2004.
- FANG, L.; WU, J.; LIN, Q.; WILLIS, W.D. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization. **J. Neurosci.**, **22**: 4196–4204, 2002.

- FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B. The use of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, **43**: 1188-1197, 2002.
- FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.; BADER, M.; CALIXTO, J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, **41**: 1006-1012, 2001.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F. Interleukin-1 $\beta$  as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, **334**: 698-700, 1988.
- FERREIRA, S.H. & LORENZETTI, B.B. Intrathecal administration of prostaglandin E<sub>2</sub> causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. **Inflamm. Res.**, **45**: 499-502, 1996.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, **48**: 129-141, 1999.
- GALAN, A.; CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 (ERK 1/2) mediate referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, **116**: 126-134, 2003.
- GALAN, A.; LOPEZ-GARCIA, J.A.; CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Activation of spinal extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 by intraplantar carrageenan in rodents. **Neurosci. Lett.**, **322**: 37-40, 2002.
- GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Role of intracellular calcium in acute thermal pain perception. **Neuropharmacology**, **47**: 935-944, 2004.

- GANET, C.; CARRVETTE, A.; FARDIN, V. Pharmacological properties of a potent and selective non peptide substance P antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **88**: 10208-10212, 1991.
- GANJU, P.; DAVIS, A.; PATEL, S.; NUNEZ, X.; FOX, A. p38 stress-activated protein kinase inhibitor reverses bradykinin B<sub>1</sub> receptor-mediated component of inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, **421**: 191-199, 2001.
- GILL, S.; GILL, R.; LEE, S.S.; HESKETH, J.C.; FEDIDA, D.; REZAZADEH, S.; STANKOVICH, L.; LIANG, D. Flux assays in high throughput screening of ion channels in drug discovery. **Assay Drug Dev. Technol.**, **1**: 709-717, 2003.
- GOEKJIAN, P.G. & JIROUSEK, M.R. Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors, and agents in development. **Curr. Med. Chem.**, **6**: 877-903, 1999.
- GRANADOS-SOTO, V.; KALCHEVA, I.; HUA, X.Y.; NEWTON, A.; YAKSH, T.L. Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. **Pain**, **85**:395–404, 2000.
- GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.**, **81**: 8-11, 1998.
- HAINS, B.C.; KLEIN, J.P.; SAAB, C.Y.; CRANER, M.J.; BLACK, J.A.; WAXMAN, S.G. Upregulation of sodium channel Na<sub>v1.3</sub> and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. **J. Neurosci.**, **23**: 8881-8892, 2003.
- HEINKE, B.; BALZER, E.; SANDKUHLER, J. Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. **Eur. J. Neurosci.**, **19**:103-111, 2004.

- HOCKERMAN, G.H.; PETERSON, B.Z.; JOHNSON, B.D.; CATTERALL, W.A.  
Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels.  
**Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **37**: 361-396, 1997.
- HOGAN, Q. Animal pain models. **Reg. Anesth. Pain Med.**, **27**: 385-401, 2002.
- HOSEY, M.M. & LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. **J. Membr. Biol.**, **104**: 81-105, 1988.
- JABBUR, S.J. & SAADE, N.E. From electrical wiring to plastic neurons: evolving approaches to the study of pain. **Pain**, **6**: 87-92, 1999.
- JI, R.R.; BEFORT, K.; BRENNER, G.J.; WOOLF, C.J. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. **J. Neurosci.**, **22**: 478-485, 2002a.
- JI, R.R. & WOOLF, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol. Dis.**, **8**: 1-10, 2001.
- JULIUS, D. & BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, **413**: 203-210, 2001.
- KASSUYA, C.A.L.; SILVESTRE, A.A.; REHDERB, V. L.G.; CALIXTO, J.B. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, **478**: 145-53, 2003.
- KHANNA, N.C; TOKUDA, M.; WAISMAN, D.M. The role of calcium binding protein in signal transduction. In: COOKE, B.A.; KING, R.J.B.; VAN DER MOLEN, H.J. **Hormone Actions. Parte II**, pp. 63, 1988.



- KHASAR, S.G.; GREEN, P.G.; CHOU, B.; LEVINE, J.D. Peripheral nociceptive effects of alpha 2-adrenergic receptor agonists in the rat. **Neuroscience**, **66**: 427-432, 1995.
- KHASAR, S.G.; LIN, Y.; MARTIN, A.; DEADGARJ.; Mc MAHON, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K.O.; ISENBERG, W.; Mc CARTER, G.; GREEN, P.G.; HODGE, C.W.; LEVINE, G.D.; MESSING, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C e mutant mice. **Neuron**, **24**: 253-260, 1999.
- KOCHEGAROV, A.A. Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. **Cell Calcium**, **33**: 145-162, 2003.
- KURIDZE, N.; CZERNICKI, Z.; JARUS-DZIEDZIC, K.; JURKIEWICZ, J.; CERVOS-NAVARRO, J. Regional differences of cerebrovascular reactivity affected by calcium channel blocker – dotarizine. **J. Neurol. Sci.**, **175**: 13-16, 2000.
- KUROKI, T.; ICHIKAWA, J.; DAI, J.; MELTZER, H.Y.R. (+)-8-OH-DPAT, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist inhibits amphetamine-induced serotonin and dopamine release in rat medial prefrontal cortex. **Brain Res.**, **16**: 357-361, 1996.
- LEVINE, J.D. & TAIWO, Y. Inflammatory Pain. *In*: Wall PD, Melzack R—Textbook of Pain, 3<sup>rd</sup> Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, pp. 45-56, 1994.
- LIANG, J.; LI, J.; WANG, X.; CHEN, B.; LU, Y.; ZHNG, Z.; HAN, R.; YE, X. L-type calcium channel blockers enhance 5-HTP-induced antinociception in mice. **Acta Pharmacol. Sin.**, **25**: 44-650, 2004.
- LI, X.; SHI, X.; LIANG, D.Y.; CLARK, D. Spinal CK2 regulates nociceptive signaling in models of inflammatory pain. **Pain**, **115**: 182–190, 2005.

- LOIKKANEN, J. & SAVOLAINEN, K.M. Glutamate increase toxicity of inorganic lead in GT 1-7 neurons: partial protection induced by flunarizine. **Arch. Toxicol.**, **77**: 663-671, 2003.
- LYDEN, P. & WAHLGREN, N.G. Mechanisms of action of neuroprotectants in stroke. **Cerebrovasc. Dis.**, **9**: 9-14, 2000.
- McMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp. Neurol.**, **192**: 444-462, 2005.
- MALMBERG, A.B. & BASBAUM, A.L. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, **76**: 215-222, 1998.
- MALMBERG, A.B.; BRANDON, E.P.; IDZERDA, R.L.; LI, H.; MCKNIGHT, G.S.; BASBAUM, A.I. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMPdependent protein kinase. **J. Neurosci.**, **17**: 7462–7470, 1997a.
- MALMBERG, A.B.; CHEN, C.; TONEGAWA, S.; BASBAUM, A.L. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . **Science**, **278**: 279-283, 1997b.
- MALMBERG, A.B. & YAKSH, T.L. Voltage-sensitive calcium channels in spinalnociceptive processing: Blockade of N-and P-type channels inhibits formalininduced nociception. **J. Neurosci.**, **14**: 4882–4890, 1994.
- MARINO, F.; COSENTINO, M.; FERRARI, M.; CATTANEO, S.; FRIGO, G.; FIETTA, A.M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G.M. Intracellular calcium changes induced by the endozepine triakontatetraneuropeptide in human polymorphonuclear leukocytes: role of protein kinase C and effect of calcium channel blockers. **Cell Commun. Signal**, **2**: 6, 2004.

- MAROTO, R.; DE LA FUENTE, M.T.; ARTALEJO, A.R.; ABAD, F.; LÓPEZ, M.G.; GARCÍA-SANCHO, J.; GARCÍA, A.G. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists on chromaffin cell death and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations induced by veratridine. **Eur. J. Pharmacol.**, **270**: 331-339, 1994.
- MAO, J.; PRICE, D.D.; PHILLIPS, L.L.; LU, J.; MAYER, D.J. Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. **Neurosci. Lett.**, **198**: 75-78, 1995.
- MATSUMURA, K.; WATANABE, Y.; ONOE, H.; WATANABE, Y. Prostacyclin receptor in the brain and central terminals of the primary sensory neurons: an autoradiographic study using a stable prostacyclin analogue  $[3\text{H}]\text{iloprost}$ . **Neuroscience**, **65**: 493– 503, 1995.
- MELZACK, R. & WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, **150**: 971-979, 1994.
- MENDELL, J.R. & SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N. Engl. J. Med.**, **348**: 1243-1255, 2003.
- MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain**, **54**: 241-289, 1993.
- MERSKEY, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. **Pain**, **6**: 249-252, 1979.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, **57**: 1-164, 1999.
- MINAMI, T.; NISHIHARA, I.; UDA, R.; ITO, S.; HYODO, M.; HAYAISHI, O. Characterization of EP-receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin E2 to mice. **Br. J. Pharmacol.**, **112**: 735-740, 1994.

- MIRANDA, H.F.; PELISSIER, T.; SIERRALTA, F. Analgesic effects of intracerebroventricular administration of calcium channel blockers in mice. **Gen. Pharmacol.**, **24**: 201-204, 1993.
- MITCHELL, V. A.; ASLAN, S.; SAFAEI, R.; VAUGHAN, C.W. Effect of the cannabinoid ajulemic acid on rat models of neuropathic and inflammatory pain. **Neurosci. Lett.**, **382**: 231-235, 2005.
- MONTIEL, C.; HERRERO, J.G.; GARCÍA-PALOMERO, E.; RENART, J.; GARCÍA, G.A. Serotonergic effects of dotarizine in coronary artery and in oocytes expressing 5-HT<sub>2</sub> receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, **332**: 183-193, 1997.
- MURAKAMI, M.; MORI, T.; NAKAGAWASAI, O.; HAGIWARA, K.; SAKURADA, Y.; MOBARAKEH, I.I.; MURATA, A.; YAMADERA, F.; MIYOSHI, I.; TAN-NO, K.; YANAI, K.; TADANO, T.; IJIMA, T. Inhibitory effect of pranidipine on N-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in mice. **Neurosci. Lett.**, **367**: 118-122, 2004.
- NAHORSKI, S.R.; YOUNG, K.W.; CHALLISS, R.A.; NASH, M.S. Visualizing phosphoinositide signalling in single neurons gets a green light. **Trends Neurosci.**, **26**: 444-452, 2003.
- NAKAYAMA, Y.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Role of prostaglandin receptor subtype EP1 in prostaglandin E2-induced nociceptive transmission in the rat spinal dorsal horn. **Brain Res.**, **1010**: 62-68, 2004.
- NAKAYAMA, Y.; OMOTE, K.; NAMIKI, A. Role of prostaglandin receptor EP1 in the spinal dorsal horn in carrageenan-induced inflammatory pain. **Anesthesiology**, **97**: 1254–1262, 2002.
- NEWTON, A.C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochem. J.**, **370**: 361–371, 2003.

- NISHIZUKA, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. **Nature**, **308**: 693-698, 1984.
- NOVALBOS, J.; ABAD-SANTOS, F.; ZAPATER, P.; CANO-ABAD, M. F.; MORADIELLOS, J.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; GARCÍA, A. G. Effects of dotarizine and flunarizine on chromaffin cell viability and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . **Eur. J. Pharmacol.**, **366**: 309-317, 1999.
- NOWYCKY, M.C.; FOX, A.P.; TSIEN, R.W. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. **Nature**, **316**: 440-443, 1985.
- OMOTE, K.; YAMAMOTO, H.; KAWAMATA, T.; NAKAYAMA, Y.; NAMIKI, A. The effects of intrathecal administration of an antagonist for prostaglandin E receptor subtype EP(1) on mechanical and thermal hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. **Anesth. Analg.**, **95**:1708-1712, 2002.
- OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **313**: 310-318, 2005.
- PALECEK, J.; PALECKOVA, V.; WILLIS, W.D. The effect of phorbol esters on spinal cord amino acid concentrations and responsiveness of rats to mechanical and thermal stimuli. **Pain**, **80**: 597-605, 1999.
- PARKER, P.J. & DEKKER, L.V. Protein kinase C. **Ed. Springer: London**, 1997.
- PARKER, P.J. & MURRAY-RUST, J. PKC at a glance. **J. Cell Sci.**, **117**: 131-132, 2004.
- PETERSEN, O.H.; PETERSEN, C.C.H.; KASAI, H. Calcium and hormone action. **Annu. Rev. Physiol.**, **56**: 297-319, 1994

- PETERSON, L.J.; ELLIS, E.; TUCKER, M.R.; HUPP, J.R. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**, 619-631, 1993.
- PLEUVRY, B.J. & LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol. Ther.**, **71**: 313-324, 1996.
- POOLE, A.W.; PULA, G.; HERS, I.; CROSBY, D.; JONES, M.L. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, **25**: 528-35, 2004
- PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary mdescending facilitation. **Trends Neurosci.**, **25**: 319-324, 2002.
- PRADO, W.A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **34**: 449-461, 2001.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. **In Textbook of Pain.** (Eds Wall, P.D., Melzack, R.), Churchill Livingstone, Edinburgh, 11-57, 1999.
- RANDO, R.R. & KISHI, Y. Structural basis of protein kinase C activation by diacylglycerols and tumor promoters. **Biochemistry**, **31**: 2211-2218, 1992.
- RANG, H.P. & URBAN, L. New molecules in analgesia. **Br. J. Anaesth.**, **75**: 145-156, 1995.
- RAVENS, U.; WETTWER, E.; HALA, O. Pharmacological modulation of ion channels and transporters. **Cell Calcium**, **35**: 575-582, 2004.
- RODE, F.; JENSEN, D.G.; BLACKBURN-MUNRO, G.; BJERRUM, O.J. Centrally-mediated antinociceptive actions of GABA(A) receptor agonists in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 2005. (in press)

- RODRIGUES, A.H. Avaliação “*in vivo*” da atividade antinociceptiva da dotarizina e da flunarizina. Dissertação de Mestrado em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 74 pág., 2005.
- ROSEN, L.B.; GINTY, D.D.; WEBER, M.J.; GREENBERG, M.E. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. **Neuron**, **12**: 1207-1221, 1994.
- RUIZ-NUÑO, A.; VILLARROYA, M.; CANO-ABD, M.; ROSADO, A.; BALFAGÓN, G.; LÓPEZ, M.G.; GARCÍA, A.G. Mechanisms of blockade by the novel migraine prophylactic agent, dotarizine, of various brain and peripheral vessel contractility. **Eur. J. Pharmacol.**, **411**: 289-299, 2001.
- RUSSO, C.M. & BROSE, W.G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.**, **49**: 123-133, 1998.
- SAMAD, T.; MOORE, K.A.; SAPIRTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J. Interleukin-1 $\beta$ -mediated induction of COX<sub>2</sub> in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, **410**: 471-475, 2001.
- SCHOLZ, J. & WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nat. Neurosci.**, **5**: 1062–1067, 2002.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, **43**: 205-216, 1990.
- SERRA, M.; DAZZI, L.; CADDEO, M.; FLORIS, C.; BIGGIO, G. Reversal by flunarizine of the decrease in hippocampal acetylcholine release in pentylenetetrazole-kindled rats. **Biochem. Pharmacol.**, **158**: 145-149, 1998.

- SHENKER, N.; HAIGH, R.; ROBERTS, E.; MAPP, P.; HARRIS.; BLAKE, D.  
Neurogenic inflammation and symmetry in medical practice. **Pain Rev.**, **8**: 27-34, 2001.
- SHERRINGTON, C.S. **The Integrative Action of the Nervous System**. Ney York: Scribner, 1906.
- SHIMIZU, N.; KISHIOKA, S.; MAEDA, T.; FUKAZAWA, Y.; YAMAMOTO, C.; OZAKI, M.; YAMAMOTO, H. Role of pharmacokinetic effects in the potentiation of morphine analgesia by L-type calcium channel blockers in mice. **J. Pharmacol. Sci.**, **94**: 240-245, 2004.
- SIEBEL, S.J.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyron in mice. **Brain Res.**, **1003**: 61-67, 2004.
- SO, H.S.; PARK, C.; KIM, H.J.; LEE, J.H.; PARK, S.Y.; LEE, J.H.; LEE, Z.W.; KIM, H.M.; KALINEC, F.; LIM, D.J.; PARK, R. Protective effect of T-type calcium channel blocker flunarizine on cisplatin-induced death of auditory cells. **Hear Res.**, **204**: 127-139, 2005.
- SPITZER, N.C.; BORODINSKY, L.N.; ROOT, C.M. Homeostatic activity-dependent paradigm for neurotransmitter specification. **Cell Calcium**, **37**: 417-423, 2005.
- STEIN, C.; MILLAN, M.J.; SHIPPENBERG, T.S.; PETER, K.; HERZ, A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **248**: 1269-1275, 1989.
- TANIGUCHI, K.; SHINJO, K.; MIZUTANI, M.; SHIMADA, K.; ISHIKAWA, T.; MENNITI, F.S.; NAGAHISA, A. Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, **122**: 809-812, 1997.



- TAYLOR, C.W. Controlling calcium entry. **Cell**, **111**: 767-769, 2002.
- TAYLOR, C.W. & LAUDE, A.J. IP<sub>3</sub> receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca<sup>2+</sup>. **Cell Calcium**, **32**: 321-334, 2002.
- TEODORI, E.; BALDI, E.; DEI, S.; GUALTIERI, F.; ROMANELLI, M.N.; SCAPECCHI, S.; BELLUCCI, C.; GHELARDINI, C.; MATUCCI, R. Design, synthesis, and preliminary pharmacological evaluation of 4-aminopiperidine derivatives as N-type calcium channel blockers active on pain and neuropathic pain. **J. Med. Chem.**, **47**: 6070-6081, 2004.
- TJOLSEN, A. & HOLE, K. Animal models of analgesia. **The pharmacology of pain.** (Ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.) : 1-20, 1997.
- TORT, A.B.; DALL'IGNA, O.P.; DE OLIVEIRA, R.V.; MANTESE, C.E.; FETT, P.; GOMES, M.W.; SCHUH, J.; SOUZA, D.O.; LARA, D.R. Atypical antipsychotic profile of flunarizine in animal models. **Psychopharmacology**, **177**: 344-348, 2005.
- URBAN, M.O. & GEBHART, G.F. Central mechanisms in pain. **Med. Clin. North Am.**, **83**: 585-596, 1999.
- VAJNA, R.; KLÖCKNER, U.; PEREVERZEV, A.; WEIERGRÄBER, M. Functional coupling between 'R-type' Ca<sup>2+</sup> channels and insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1. **Eur. J. Biochem.**, **268**: 1066-1075, 2001.
- VANE, J.R. & BOTTING, R.M. New insights into the model of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, **44**: 1-10, 1995.
- VERMA, V.; MEDIRATTA, P.K.; SHARMA, K.K. Interaction of pentazocine with calcium channel blocking drugs during chemical and thermal pain in mice. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, **44**: 255-264, 2000.

- VERMA, V.; MEDIRATTA, P.K.; SHARMA, K.K. Potentiation of analgesia and reversal of tolerance to morphine by calcium channel blockers. **Indian J. Exp. Biol.**, **39**: 636-642, 2001.
- WEIZMAN, R.; GETSLEV, V.; PANKOVA, I.A.; SCHRIEBER, S.; PICK, C.G. Pharmacological interaction of the calcium channel blockers verapamil and flunarizine with the opioid system. **Brain Res.**, **818**: 187-195, 1999.
- WEN, L.; YANG, S.; ZHOU, W.X.; ZHANG, Y.X.; ZHOU, X.W.; HUANG, P.T. Involvement of N-type calcium channels in pain and antinociception. **Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.**, **36**: 23-28, 2005.
- WOOLF, C.J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor  $\alpha$ . **Br. J. Pharmacol.**, **121**: 417-424, 1997.
- WOOLF, C.J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. **Nature**, **306**: 686-688, 1983.
- WOOLF, C.J. & SALTER, M.W. neural plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, **288**: 1765-1768, 2000.
- YAJIMA, Y.; NARITA, M.; SHIMAMURA, M.; NARITA, M.; KUBOTA, C.; SUZUKI, T. Differential involvement of spinal protein kinase C and protein kinase A in neuropathic and inflammatory pain in mice. **Brain Res.**, **992**: 288-293, 2003.
- YASHPAL, K.; PITCHER, G.M.; PARENT, A.; QUIRION, R.; CODERRE, T.J. Noxious thermal and chemical stimulation induce increase in  $^3\text{H}$ -phorbol12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. **J. Neurosci.**, **15**: 3563-3272, 1995.

- ZAMPONI, G.W. & SNUTCH, T.P. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. **Curr. Opin. Neurobiol.**, **8**: 351-356, 1998.
- ZEITZ, K.P.; MALMBERG, A.B.; GILBERT, H.; BASBAUM, A.L. Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC $\gamma$  mutant mice. **Pain**, **94**: 245-253, 2001.
- ZHOU, Y.; ZHOU, Z.; ZHAO, Z. PKC regulates capsaicin-induced currents of dorsal root ganglion neuron in rats. **Neuropharmacology**, **41**: 601-608, 2001.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, **16**: 109-110, 1983.